

# 荧光标记法初探植物乳杆菌 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附机理

陈臣<sup>1</sup> 周方方<sup>1</sup> 吴正钧<sup>1</sup> 王荫榆<sup>1</sup> 陈卫<sup>2</sup> 张灏<sup>2</sup> 郭本恒<sup>1\*</sup>

(1. 光明乳业股份有限公司 技术中心 乳业生物技术国家重点实验室 上海 200072)

(2. 江南大学食品学院 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 利用荧光探针 CFDA-SE 标记植物乳杆菌 ST-III, 测定其对 Caco-2 细胞粘附能力的变化, 提取相关物质, 探讨其粘附机理。化学和酶处理 ST-III 菌悬液发现, 经胃蛋白酶、胰蛋白酶、氯化锂、苯酚、盐酸胍和热处理能显著降低 ST-III 的粘附性, 表明表面蛋白或脂磷壁酸(Lipoteichoic acid)可能参与了 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附。粘附抑制试验和可逆性结合实验证实表面蛋白而非脂磷壁酸参与了 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附。结果表明 ST-III 的表面蛋白粗提物可能含有粘附素类的 S-层蛋白(S-layer protein), 经 SDS-PAGE 电泳分析, 此粗提物主要成分的分子量分别为 72.7、34.1 和 24.3 kD。  
**关键词:** 植物乳杆菌, 粘附, 荧光标记, 表面蛋白

## A Fluorescence Labeling Method for the Study on Mechanism of Adhesion of *Lactobacillus plantarum* ST-III on Caco-2 Cells

CHEN Chen<sup>1</sup> ZHOU Fang-Fang<sup>1</sup> WU Zheng-Jun<sup>1</sup> WANG Yin-Yu<sup>1</sup> CHEN Wei<sup>2</sup>  
ZHANG Hao<sup>2</sup> GUO Ben-Heng<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center Bright Dairy & Food Co., Ltd, Shanghai 200072, China)

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology School of Food Science and Technology Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** To study the mechanism of adhesion of *Lactobacillus plantarum* ST-III on Caco-2 cells, the adhesive ability of the bacterial cell to the mammal cells was investigated by fluorescence labeling with CFDA-SE and the components on the cell surface involved in the adhesion were extracted. After treatments by chemicals and enzymes, it was shown that pepsin, trypsin, LiCl, phenol, guanidine hydrochloride and heat treatment could significantly decrease the adhesive ability of ST-III, indicating that the S-layer protein or lipoteichoic acid may be related to the adhesion of ST-III to Caco-2 cells. The suppressive test and reversible binding test confirmed that the S-layer protein mediated the adhesion process, whereas the lipoteichoic acid on the bacterial cell surface did not participated in the adhesion. The

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2006BAD04A14)

\*通讯作者: Tel: 86-21-54584520; 信箱: guobenheng@brightdairy.com

收稿日期: 2009-08-26; 接受日期: 2009-11-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

results showed that the crude surface protein extracts of ST-III might contain S-layer protein which participated in the adhesion. The SDS-PAGE assay showed that the crude extracts was composed of three proteins with molecular weight of 72.7 kD, 34.1 kD and 24.3 kD respectively.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, Adhesion, Fluorescence labeling, S-layer protein

乳酸菌对肠道表面的粘附能力可为其提供竞争优势,是其在消化道中长期存在的必要条件,因此,粘附能力是益生菌筛选的重要标准之一<sup>[1-2]</sup>。研究表明类似于酶-底物相互作用的特异性粘附是决定某些乳酸菌粘附的主要方式,介导这种粘附作用的细菌粘附因子称为粘附素(Adhesin)。粘附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步,细菌的粘附素与宿主细胞表面的特异性粘附素受体识别后,两者随之结合,引起一系列细胞变化过程。

细菌粘附与其细胞壁的组成有着密切的关系,细胞壁是粘附素的主要来源。早在 1985 年, Camp 等<sup>[3]</sup>在研究双歧杆菌粘附时发现,其细胞壁上的脂磷壁酸(Lipoteichoic acid, LTA)与其粘附有关,提示 LTA 参与了乳杆菌对肠上皮细胞的粘附。随后,一些学者又先后发现乳杆菌的胞壁表面蛋白(S-layer protein)以及胞外分泌型蛋白等也与粘附有关<sup>[4-5]</sup>。迄今为止,人们已经对很多乳杆菌的粘附素进行了研究,有的已得到其基因序列,但对其粘附的具体机制以及粘附素的性质仍缺乏较为深入的研究。

前面的研究发现ST-III是一株对Caco-2细胞具有强粘附性质的植物乳杆菌,本文利用化学处理和酶处理ST-III细胞壁表面的成分,5-(6-)羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯[5-(6-)carboxyfluorescein diacetate, succi-nimidyl ester, CFDA-SE]荧光标记后测定粘附性质的变化,分析参与粘附的成分,提取相关物质,以期能对ST-III的粘附素及其粘附机理进行初步地研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和细胞

植物乳杆菌 ST-III (*Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 0847)、致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli* EPEC AS 1.72)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritis* 50041)由光明乳业技术中心提供,人肠上皮样细胞 Caco-2 细胞株由上海瑞金医院消化外科研究所提供。

### 1.2 仪器和试剂

ULTIMA 型 CO<sub>2</sub> 培养箱: RUSKINN 公司; CE7250 型紫外分光光度计: BIO-AQUARIUS 公司; FACSCalibur 型流式细胞仪: BD 公司; LS50B 型荧光分光光度计: PERKIN ELMER 公司; PRO-3 型垂直平板电泳仪: BIO-RAD 公司; 透析袋(< 12 kD): 上海华美生物工程公司; 过滤膜(0.22 μm): Millipore 公司。

MRS (Man-Rogosa-Sharpe)培养基购自德国 Merck 公司; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养液、0.25%胰酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司; 类胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司。5-(6-)羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFDA-SE)、胃蛋白酶(EC 3.4.23.1, 比活力 453 U/mg)、胰蛋白酶(EC 3.4.21.4, 比活力 11800 U/mg)、RNase (EC 232.646.6, 比活力 50-100 U/mg)和 DNase (EC232.667.0, 比活力 2140 U/mg)均购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯或化学纯。DMEM 完全培养液由 78% DMEM 培养液、20%胎牛血清、1%链霉素(100 μg/mL)、1%青霉素(100 U/mL)组成,用于 Caco-2 细胞的常规培养; DMEM 的不完全培养液由 80% DMEM 培养液、20%胎牛血清组成,用于粘附试验。

### 1.3 微生物培养及菌悬液的制备

ST-III保存在-84℃ 含有 10% (V/V)甘油的 MRS 液体培养基中。试验时平板活化后挑取单一菌落接种于 MRS 液体培养基, 37℃ 培养 12-14 h, 连续转接 2 代。将活化好的乳杆菌按 1% (V/V)的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37℃ 培养 12 h, 离心收集菌体(8000 × g, 4℃, 10 min), 用无菌 PBS (pH 7.3)洗涤 3 次, 将菌体重悬于 PBS 中, 根据平板计数的结果调整 600 nm 处菌悬液的 OD 值至 1.0 × 10<sup>9</sup> CFU/mL。

### 1.4 细胞培养

Caco-2加细胞冷冻液保存在液氮中(-196℃)。试验时, 细胞经复苏后置于培养瓶, 加入DMEM完

全培养液后, 于37°C、CO<sub>2</sub>浓度为5%的培养箱中孵育, 待细胞生长良好时(70%融合), 用0.25%胰酶-EDTA消化传代。细胞贴壁生长, 通常2 d更换培养液, 4 d进行传代, 传代5次左右进行粘附试验。

### 1.5 细菌的荧光标记

按照 Logan 的方法<sup>[6]</sup>略加改动, 用 DMSO 配制 CFDA-SE 浓度为 1 mmol/L 贮备液, 用 0.2 μm 膜过滤除菌后于-20°C 保存备用。实验时将 5 mL ST-III 菌悬液(浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL)中加入不同体积的 CFDA-SE 贮备液, 37°C 避光孵育一定时间。将菌悬液离心( $8000 \times g$ , 4°C, 10 min)弃上清, 以除去未标记上的 CFDA-SE。重新悬浮后用荧光分光光度计测定菌悬液的荧光强度, 其中激发波长  $\lambda_{ex} = 492$  nm; 发射波长  $\lambda_{em} = 517$  nm, 狭缝宽 2.5 nm。

选用不同的 CFDA-SE 浓度和孵育时间进行预实验, 选择最佳的标记条件。流式细胞仪检测 CFDA-SE 对 ST-III 的荧光标记率。

### 1.6 粘附试验

荧光标记法: 将培养好的 Caco-2 细胞进行消化, 用 DMEM 的不完全培养液稀释细胞使浓度达到约  $5 \times 10^5$ /mL。滴加 1 mL 于 35 mm × 10 mm 细胞培养皿中, 于二氧化碳培养箱中 37°C 孵育至细胞贴壁后, 补充细胞培养液继续培养。待细胞长至单层时, 以无菌 PBS (pH 7.3) 洗涤 1 次, 每个培养皿中加入 1 mL 经 CFDA-SE 标记的 ST-III 菌悬液(浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL)进行粘附试验, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵育 2 h, 用无菌 PBS 洗涤培养皿 3 次, 除去未粘附的细菌。之后每个培养皿中加入 0.7 mL 胰酶作用 10 min, 待细胞完全脱落, 加入 0.3 mL 培养液终止反应。收集液体, 测定其荧光强度, 按下式计算粘附率。

$$\text{粘附率}(\%) = \frac{\text{粘附实验后的荧光强度}}{\text{细菌原始的荧光强度}} \times 100\%$$

平板计数法: 粘附实验后, 将混合物转移到试管中, 经系列稀释后, 平板菌落计数, 与原始菌数相比, 计算粘附率。

### 1.7 化学和酶处理对粘附的影响

#### (1) 胃蛋白酶

将胃蛋白酶溶解于 0.05 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液(pH 2.2)中, 制成 400 U/mL 的溶液, 后过滤除菌(0.22 μm)。将 ST-III 菌体悬浮于胃蛋白酶溶液中制成浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 的菌悬液(浓度下同), 37°C

作用 30 min。

#### (2) 胰蛋白酶

将胰蛋白酶溶解于 0.2 mol/L 的 PBS (pH 8.0) 中, 制成 400 U/mL 的溶液, 后过滤除菌(0.22 μm)。将 ST-III 菌体悬浮于胰蛋白酶溶液中, 37°C 作用 30 min。

#### (3) 氯化锂

将 ST-III 菌体悬浮于经高压灭菌的 5 mol/L 氯化锂, 混合后冰浴 30 min。

#### (4) 盐酸胍

将 ST-III 菌体悬浮于经高压灭菌的 4 mol/L 盐酸胍, 磁力搅拌器搅拌(720 r/min, 37°C 30 min)。

#### (5) 高碘酸钠

将 ST-III 菌体悬浮于 0.05 mol/L 的高碘酸钠(溶解于 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液, pH 4.5), 以 0.05 mol/L 的碘酸钠作为空白对照, 37°C 作用 30 min。

#### (6) 苯酚

将 ST-III 菌体悬浮于饱和酚溶液中, 65°C 作用 30 min, 在室温下漩涡混合(2800 r/min, 30 min)。

#### (7) 热

将 ST-III 菌体于 100°C 处理 5 min。

将按照上述方法处理过的菌体离心( $10000 \times g$ , 4°C, 10 min)收集, PBS 洗涤后重悬于 PBS, 制成浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 的菌悬液, 荧光标记后进行粘附试验, 以未进行处理的 ST-III 作为对照, 比较粘附率。

### 1.8 表面蛋白粗提物的提取

表面蛋白粗提物(Crude S-layer protein)的提取采用氯化锂法和盐酸胍法两种方法。

氯化锂法: 将 ST-III 菌体悬浮于经高压灭菌的 5 mol/L 氯化锂, 混合后冰浴 30 min, 离心( $17000 \times g$ , 4°C, 10 min)收集上清。选用截留极限为 12 kD 的透析袋, 将上清液对水透析 48 h (4°C), 每 6 h 换水 1 次。收集样品, 冻干备用。

盐酸胍法: 将 ST-III 菌体悬浮于经高压灭菌的 4 mol/L 盐酸胍, 磁力搅拌器搅拌(720 r/min, 37°C, 30 min), 其余同氯化锂法。

### 1.9 表面蛋白粗提物性质的测定

采用考马斯亮蓝 G250 法测粗提物中蛋白的含量, SDS-PAGE 不连续电泳测定表面蛋白的分子量。

### 1.10 脂磷壁酸粗提物的提取

脂磷壁酸(LTA)的提取参照 Gusils 等<sup>[7]</sup>的方法,

并略做改动。收集 ST-III 菌体, 悬浮于 PBS (pH 7.3), 超声间歇破碎细胞(15 次, 超声 90 s, 间歇 30 s), 将菌体悬浮于 4% 的 SDS 溶液, 水浴煮沸 2 h。之后重复前面步骤, 直到细胞破碎达到 70% 左右。离心洗涤菌体, 加入胰蛋白酶、RNase、DNase 使终浓度分别达到 100、50、100  $\mu\text{g/mL}$ , 37°C 作用 12 h。用 PBS 洗涤菌体, 每 50 mg 菌体加入 1.5 mL 10% 的三氯乙酸, 4°C 搅拌作用 24 h。离心菌体, 将上清液透析 48 h (4°C), 每 6 h 换水 1 次。收集样品, 冻干备用。

### 1.11 粘附抑制试验

按照 Rojas 等<sup>[8]</sup>的方法进行粘附抑制试验。于长至单层的 Caco-2 细胞中加入 2 mL 经过滤除菌的表面蛋白粗提物溶液和脂磷壁酸粗提物溶液(浓度分别为 5、10、15 和 20  $\mu\text{g/mL}$ ), 以 PBS 作为空白对照, 37°C 孵育 2 h。用无菌 PBS 洗涤 2 次, 再进行粘附试验, 测定两种物质对 ST-III 粘附的抑制作用。

### 1.12 表面蛋白可逆性结合细胞壁的验证

离心收集 1 L ST-III 培养物, 盐酸胍法提取表面蛋白粗提物。之后将处理过的菌体重悬于提取到的表面蛋白粗提物溶液中, 4°C 孵育过夜, 离心收集细菌。分别以不进行任何处理的 ST-III 菌悬液和去除表面蛋白后的菌悬液作为阳性和阴性对照, 进行粘附实验, 考察表面蛋白的可逆性结合性质<sup>[9]</sup>。

### 1.13 数据分析

实验结果用平均值 $\pm$ 标准差来表示。采用 Origin7.5 对实验数据进行做图及拟合处理。采用 SPSS10.0 软件, 进行独立样本 T 检验和单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 荧光标记结果和粘附测定方法的相关性分析

对 ST-III (浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL) 进行荧光标记试验得到最佳标记条件为: 20  $\mu\text{mol/L}$ , 37°C, 20 min。使用流式细胞仪检测其标记率达到  $(92.63 \pm 1.35)\%$ , 见图 1。选用  $1.0 \times 10^8$ – $1.0 \times 10^9$  CFU/mL 浓度的 ST-III 菌液, 使用两种方法测定其粘附率, 得到两种方法的相关性图, 见图 2。荧光标记法所得数值均高于平板计数法所得数值, 两者呈明显的正相关( $r = 0.939$ ,  $P = 0.005$ )。

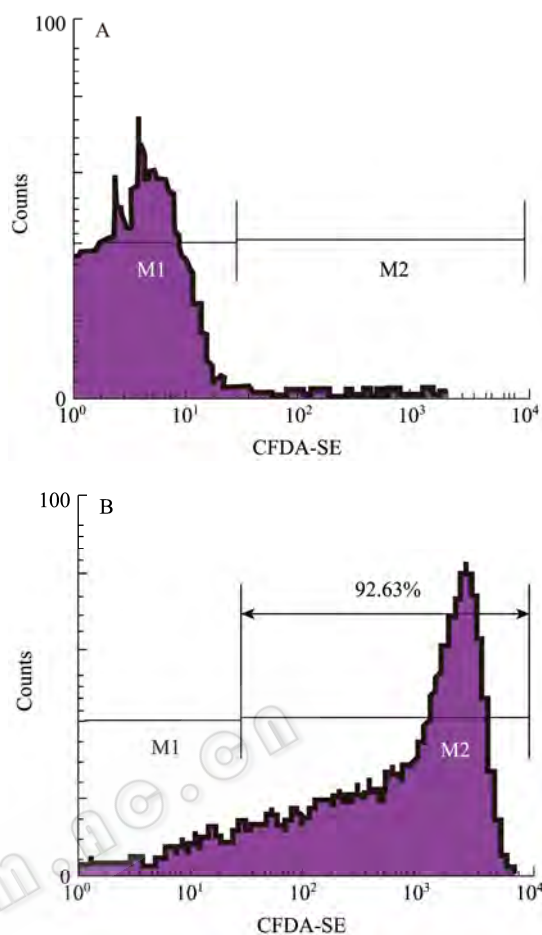


图 1 CFDA-SE 标记前(A)、后(B)的 ST-III 的流式细胞图(前散射 vs. 荧光)

Fig. 1 Flow cytometric profile (forward scatter vs. fluorescence) of ST-III labeled with (B) and without (A) CFDA-SE. Note: A clear shift in fluorescence was shown with in the labeled bacteria (B) compared with the unlabeled bacteria (A).

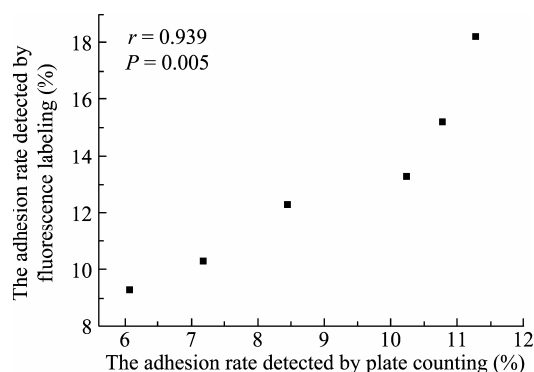


图 2 荧光标记法和平板标记法检测粘附性质的相关性图

Fig. 2 The correlation between plate counting and fluorescence labeling in detecting the adhesive ability

### 2.2 化学和酶处理对粘附的影响

用胃蛋白酶、胰蛋白酶、氯化锂、苯酚、盐酸胍、热、高碘酸钠对 ST-III 进行处理后, 再进行粘附

试验。胃蛋白酶、胰蛋白酶用以破坏细胞壁表面的蛋白质, 氯化锂、盐酸胍可除去细胞表面通过非共价结合的蛋白<sup>[10]</sup>, 苯酚可以破坏细胞表面的非纤维状蛋白和脂磷壁酸<sup>[11]</sup>, 热处理可同时强烈破坏细胞壁表面蛋白、脂磷壁酸和碳水化合物, 高碘酸钠则可破坏细胞表面碳水化合物。试验结果见图 3。

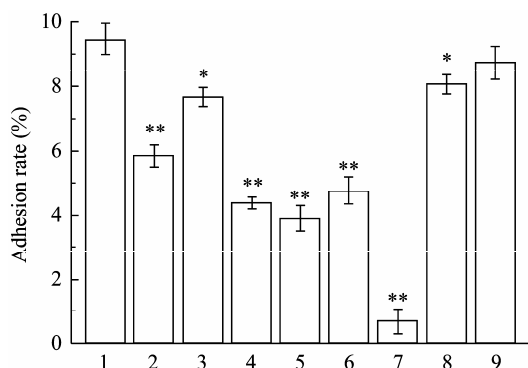


图 3 化学和酶处理对 ST-III 粘附能力的影响

Fig. 3 Effects of chemical and enzymatic treatments on adhesion of ST-III to Caco-2 cells

Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$  (Compared with control). 1: Control; 2: Pepsin; 3: Trypsin; 4: LiCl; 5: Phenol; 6: Guanidine hydrochloride; 7: Heat treatment; 8: NaIO<sub>4</sub>; 9: NaIO<sub>3</sub>.

结果发现 ST-III 对胃蛋白酶、胰蛋白酶、氯化锂、苯酚、盐酸胍、热处理均具有敏感性, ST-III 经这些物质处理后粘附率显著降低(除胰蛋白酶作用  $P < 0.05$  外, 其余  $P < 0.01$ )。高碘酸钠处理后与空白组相比也能降低 ST-III 的粘附率( $P < 0.05$ ), 但与碘酸钠比较并无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 表面蛋白质质的测定

考马斯亮蓝 G250 法测量经氯化锂和盐酸胍提取的 ST-III 表面蛋白粗提物的蛋白含量分别为 23.11% 和 13.67%。对两种方法粗提的表面蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析结果见图 4。对比两种方法发现, 5 mol/L 氯化锂提取的样品杂蛋白较多, 可能是作用强度过大, 将膜蛋白部分也提取下来, 而 4 mol/L 盐酸胍提取出的样品杂蛋白很少, 条带很清晰, 故主要采用盐酸胍的方法提取 ST-III 的表面蛋白。通过相对迁移率测得其成分的分子量分别为 72.7、34.1、24.3 kD。

### 2.4 粘附抑制实验

由于以上处理去除特定细胞组分的特异性不强, 所以进一步用粘附抑制试验对粗提表面蛋白的粘附素活性进行了分析。将所提取的粗提表面蛋白

(含 S 层蛋白, S-layer protein 组分) 和脂磷壁酸粗提物(含 LTA 组分) 分别加入 Caco-2 细胞共孵育 2 h 后, 再进行粘附试验, 试验结果见图 5。单因素方差分析得知, 加入的表面蛋白对 ST-III 与 Caco-2 细胞的粘附有显著影响( $P < 0.01$ ); 加入表面蛋白后与对照组相比, 除 5  $\mu\text{g/mL}$  外( $P < 0.05$ ), 其余均能非常显著地降低 ST-III 的粘附率( $P < 0.01$ ); 而加入脂磷壁酸与对照组相比, 对 ST-III 的粘附率几乎没有影响( $P > 0.05$ )。

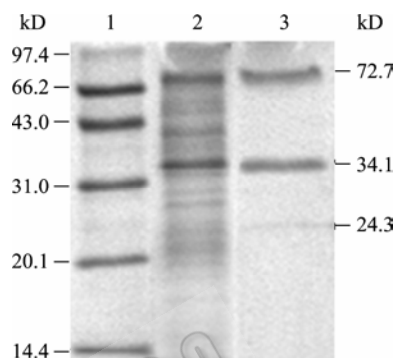


图 4 SDS-PAGE 电泳测定 ST-III 菌体表面蛋白粗提物分子量

Fig. 4 The molecular weight of crude S-layer protein from ST-III detected by SDS-PAGE

Note: 1: Low molecular weight protein standards marker; 2: Crude S-layer protein extracted by 5 mol/L LiCl; 3: Crude S-layer protein extracted by 4 mol/L guanidine hydrochloride.

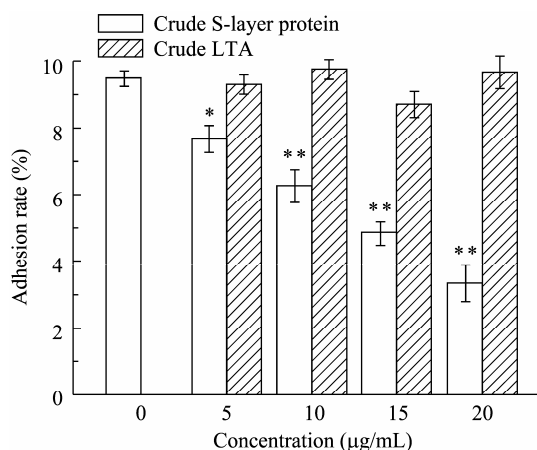


图 5 表面蛋白和脂磷壁酸粗提物对 ST-III 粘附的抑制情况  
Fig. 5 The inhibition of crude S-layer protein and lipoteichoic acid to the adhesion of ST-III

Note: \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$  (Compared with control).

### 2.5 表面蛋白粗提物可逆性结合细胞壁的验证结果

表面蛋白具有可逆地与细胞壁再次结合的能力<sup>[10]</sup>, 把用盐酸胍处理过的 ST-III 菌体重悬于抽提出来的粗提表面蛋白溶液中, 孵育过夜, 再进行粘

附试验, 试验结果见表 1。发现经如此处理后, 尽管其粘附率与未处理的菌体相比仍有差异( $P < 0.05$ ), 但与经盐酸胍提取后的菌体相比已显著提高( $P < 0.01$ )。

表 1 表面蛋白粗提物可逆性结合对 ST-III 粘附的影响  
Table 1 The effect of reversible binding of crude S-layer protein on the adhesion of ST-III

处理 Treatment	粘附率 (%) Adhesion rate (%)
未处理(阳性对照) ST-III untreated (Positive control)	9.40 ± 0.23
盐酸胍处理(阴性对照) ST-III extracted by guanidine hydrochloride (Negative control)	4.82 ± 0.41
菌体盐酸胍处理后与表面蛋白粗提物孵育 ST-III incubated with crude S-layer Protein after extracted by guanidine hydrochloride	8.46 ± 0.33 <sup>***</sup>

Note: \*:  $P < 0.05$ , compared with positive control; \*\*:  $P < 0.01$ , compared with negative control.

### 3 讨论

研究表明, 细菌对肠道上皮细胞的粘附分为两个阶段: 第 1 阶段为聚集和吸附阶段, 细菌接近粘膜上皮细胞表面并发生非特异性的结合; 第 2 阶段为特异性粘附阶段, 细菌表面的粘附素与细胞表面的受体通过化学键等特异性结合。粘附素是一类存在于微生物的菌毛、细胞壁、外膜蛋白、鞭毛、荚膜、与微生物粘附作用密切相关的特殊物质, 可能是蛋白质、多肽、糖蛋白、糖脂和多糖或单糖, 具有多种结构和功能。目前关于乳杆菌和双歧杆菌的粘附素研究主要有 3 种学说: 脂磷壁酸、表面蛋白(S-层蛋白)、细菌表面分子, 不同菌株的粘附素不同, 表明粘附性能具有种属特异性。本文利用荧光标记的方法, 分析参与粘附的成分, 以期能对 ST-III 的粘附机理进行初步的研究。

CFDA-SE 是一种酯化荧光素衍生物制备的分子探针, 可通过简单扩散透过细胞膜进入胞内<sup>[12]</sup>, 进入后可被细胞内的非特异性酯酶水解, 释放出能发黄绿色荧光的 CFSE。目前认为, 是一些低转化率的蛋白(如某些细胞骨架成分)使其长期稳定地储留在细胞内。只要细胞膜保持完整, 经过最初的一段平衡时间, CFDA-SE 标记的静止细胞的荧光可在长达几个月的时期内保持稳定<sup>[13]</sup>。本实验利用其标记经化学或酶处理过的乳酸菌研究粘附率的改变, 分

析粘附素组成, 替代存在危险性并需要特殊设备的同位素标记法和并不能测定死菌的平板计数法。CFDA-SE 荧光标记法和平板计数法的相关关系图表明, 用 CFDA-SE 进行荧光标记后测定荧光强度的改变可以很好地用来检测粘附性质的变化, 荧光标记法所得数值均高于平板计数法所得数值, 可能是由于一些已经死亡的细菌其仍具有粘附能力而能被荧光标记法测定出的缘故。

化学或酶处理被广泛地用于研究乳酸菌的粘附素<sup>[4,14-15]</sup>, 本实验中胃蛋白酶处理可以明显地消除 ST-III 的粘附性, 说明蛋白质参与了粘附过程。胰蛋白酶虽然也能降低粘附度, 但作用不如胃蛋白酶强, 暗示 ST-III 的粘附素对胰蛋白酶不敏感。氯化锂和盐酸胍处理可以明显降低粘附度, 表明粘附素可能以非共价结合的方式存在于细胞表面。苯酚处理可以破坏细胞表面的非纤维状蛋白和脂磷壁酸, 所以蛋白和脂磷壁酸均有可能参与到 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附中。热处理可强烈破坏细胞壁, 说明细胞表面的粘附素是热敏感的分子或热处理可以使其从细胞表面脱落。De Vuyst<sup>[16]</sup>等人认为表面层的碳水化合物与粘附有关, 许多乳酸菌都能产生胞外多糖(EPS), 可能参与其粘附过程。碘酸钠是高碘酸钠被还原的产物, 本试验中, 高碘酸钠处理后与碘酸钠相比粘附性并无变化, 表明碳水化合物并没有参与到粘附抑制过程中。综合以上分析, 表明表面蛋白或者脂磷壁酸可能参与了 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附。

为了进一步分析 ST-III 的粘附素成分, 将表面蛋白和脂磷壁酸分别提取出来, 进行粘附抑制试验。试验发现加入表面蛋白后与对照组相比, 能显著降低 ST-III 的粘附率, 而加入脂磷壁酸与对照组相比, 对 ST-III 的粘附率几乎没有影响, 表明是表面蛋白而非脂磷壁酸参与了 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附。表面蛋白可逆性结合试验验证了其具有可逆地结合到细胞壁的性质, 同时也证明了表面蛋白参与到 ST-III 对 Caco-2 细胞的粘附过程中。

磷壁酸、多糖、肽聚糖和表面蛋白等是乳酸菌粘附素的主要来源, 这些物质在粘附过程中直接或间接地起着一定的作用, 但粘附素存在明显的菌种特异性, 不同的乳酸菌粘附素不同。对于植物乳杆菌来说, Adlerberth 等<sup>[17]</sup>人发现植物乳杆菌粘附肠道

上皮细胞的物质基础是甘露糖特异性凝集素, 这种凝集素对蛋白酶 K 敏感, 暗示其为蛋白类物质或含有蛋白类成分; 孙进<sup>[9]</sup>发现甘露糖特异性凝集素可能是介导植物乳杆菌 Lp6 粘附大鼠小肠黏液的主要因素, 经 SDS-PAGE 分离, 该凝集素是分子量小于 60 kD 的表面非共价结合蛋白。本试验所发现的 ST-III 的表面蛋白粗提物可能含有粘附素类的 S 层蛋白。此粗提物主要有 3 条分子量分别为 72.7、34.1 和 24.3 kD 的蛋白组分, 但以前的研究表明乳酸菌表面蛋白的分子量范围约在 40–71 kD 之间<sup>[18–19]</sup>, 所以本文的结果与其存在一定的差异。由于表面蛋白可以以二聚体或多聚体的形式存在, 因而所得到的粗提物是由单一蛋白的多种聚合体组成的还是由不同种蛋白组成尚需进一步纯化和鉴定。

## 参 考 文 献

- [1] Brassart D, Neeser JR, Michetti P, *et al.* The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal epithelial cells. *Actes du Colloque Lactic*, 1994(94): 201–212.
- [2] Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ, *et al.* Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci Technol*, 1999, **21**(10): 405–410.
- [3] Camp HJ, Oosterhof A, Veerkamp JH. Interaction of bifidobacteria lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 1985(47): 332–334.
- [4] Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(12): 4487–4494.
- [5] Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, *et al.* Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**(8): 1689–1696.
- [6] Logan RPH, Robins A, Turner GA, *et al.* A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Immunol Methods*, 1998(213): 19–30.
- [7] Gusils C, Cuozzo S, Sesma F, *et al.* Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can J Microbiol*, 2002(48): 34–42.
- [8] Rojas M, Conway PL. A dot-blot assay for adhesive components relative to probiotics. *Methods Enzymol*, 2001(336): 389–402.
- [9] 孙进. 乳酸菌肠道黏附及其菌体或肽聚糖免疫调节作用研究. 江南大学博士学位论文, 2006.
- [10] Sara M, Sleytr UB. S-Layer Proteins. *J Bacteriol*, 2000, **182**(4): 859–868.
- [11] Jacques M, Costerton W. Adhesion of group B *Streptococcus* to a polyethylene intrauterine contraceptive device. *FEMS Microbiol Lett*, 1987(41): 23–28.
- [12] Chrzanowski TH. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb Ecol*, 1984(V10): 179–185.
- [13] 肇静娴, 曾耀英, 何贤辉, 等. 活体染料 CFDA-SE 在淋巴细胞增殖研究中的应用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, **19**(2): 109–111.
- [14] Zarate G, de Morata A, Perez CA, *et al.* Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Can J Microbiol*, 2002, **48**(5): 449–457.
- [15] Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int J Food Microbiol*, 2000, **60**(1): 75–81.
- [16] De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1999(23): 153–177.
- [17] Adlerberth I, Ahrne S, Johansson ML, *et al.* A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(7): 2244–2251.
- [18] Boot HJ, Pouwels PH. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol Microbiol*, 1996, **21**(6): 1117–1123.
- [19] Sleytr UB, Messner P, Sára M. Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential. *J Appl Bacteriol*, 1993(74): 21–32.