论著·基础医学

生物素-链霉亲和素标记技术实现病原菌示踪与含菌吞噬体纯化并用于胞内病原菌免疫逃逸机制解析

郑森泉[1],胡治强[1],唐致恒[1],乔建鹏[1],莫舜民[1],文远[1],饶承龙[1],闫晶敏[1],毛旭虎[1,2],李 倩[1,2] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室,[2]创伤与化学中毒全国重点实验室,重庆

[摘要] **目的** 基于生物素-链霉亲和素系统(biotin-streptavidin system,BSA)的特异性结合及信号放大效应,假设构建的生物素-链霉亲和素标记技术可在不影响病原菌生物学特性及感染能力前提下,实现病原菌的示踪与含菌吞噬体的分离,并初步用于解析胞内病原菌免疫逃逸的分子机制。本研究旨在验证该假设,为病原菌-宿主互作研究提供技术支撑。**方法** ①以类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,*B. p*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*,*S. t*)和福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*,*S. f*)为研究对象,以J774A.1巨噬细胞构建细菌-宿主细胞感染互作模型,设置生物素-链霉亲和素标记组与未标记组。通过NHS-生物素与细菌膜氨基共价结合,偶联链霉亲和素-FITC构建示踪体系,或偶联链霉亲和素磁珠用于磁分选分离。②采用免疫荧光实验检测标记效率及胞内分布,并在感染复数(multiplicity of infection,MOI)=10的条件下分别感染1、3、5 h,比较细胞感染率、单细胞胞内菌载量及胞内存活情况。③ELISA检测细胞上清IL-1β、IL-12和TNF-α分泌水平。④进一步以磁珠标记菌感染细胞,于1、2 h或3、5 h磁分选分离含菌吞噬体,Western blotting检测吞噬体标志物Rab5、Rab7、LAMP-2及胞质内参GAPDH表达以鉴定分离纯度。⑤应用该技术对*B. p*野生型与*bopA*基因敲除株(Δ*bopA*株)的含菌吞噬体进行蛋白质谱分析。**结果** 该标记体系对*B. p*、*S. t*、*S. f*的标记效率均达90%以上,且荧光信号均一、无非特异性吸附;标记组与未标记组在感染1、3、5 h后的细胞感染率、单细胞胞内菌载量、胞内存活趋势及胞内分布模式等差异无统计学意义($P>0.05$);ELISA结果显示,标记组与未标记组IL-1β、IL-12和TNF-α分泌水平差异无统计学意义($P>0.05$)。磁分选获得的含菌吞噬体中,Rab5、Rab7和LAMP-2蛋白表达显著高于胞质组分($P<0.05$),胞质GAPDH在吞噬体中污染极低。蛋白质组学分析显示,与*B. p*野生型相比,Δ*bopA*株含菌吞噬体中VAMP7、EEA1、RABEP1和RAB3GAP2等囊泡转运相关宿主蛋白显著上调。**结论** 本研究构建的生物素-链霉亲和素标记与磁分选体系不改变病原菌生物学特征、宿主细胞感染能力及诱导炎症因子分泌水平;该体系可完成病原菌荧光示踪,并分离得到高纯度的含菌吞噬体,可应用于初步解析病原菌相关效应蛋白介导宿主防御逃逸的潜在机制研究。

[关键词] 生物素-链霉亲和素;病原菌标记;含菌吞噬体分离;抗感染免疫
[中图法分类号] R372;R378;R446.5 [文献标志码] A

Application of biotin-streptavidin labeling technology for pathogen tracing, bacteria-containing phagosome purification, and immune evasion mechanisms of intracellular pathogens

Zheng Senquan[1], Hu Zhiqiang[1], Tang Zhiheng[1], Qiao Jianpeng[1], Mo Shunmin[1], Wen Yuan[1], Rao Chenglong[1], Yan Jingmin[1], Mao Xuhu[1,2], Li Qian[1,2] [1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective Based on the specific binding and signal amplification effects of the biotin-

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(32300161);新重庆青年创新人才项目(CSTB2024NSCQ-QCXMX0055)
[通信作者] 李 倩,E-mail:liqianjane@163.com

2097-0927/Copyright © 2026,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:郑森泉,胡治强,唐致恒,等.生物素-链霉亲和素标记技术实现病原菌示踪与含菌吞噬体纯化并用于胞内病原菌免疫逃逸机制解析[J].陆军军医大学学报,2026,48(17):2494-2505.DOI:10.16016/j.2097-0927.202605066.

Citation:Zheng S Q,Hu Z Q,Tang Z H,*et al*. Application of biotin-streptavidin labeling technology for pathogen tracing, bacteria-containing phagosome purification, and immune evasion mechanisms of intracellular pathogens[J]. J Army Med Univ,2026,48(17):2494-2505. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605066.

streptavidin system, a hypothesis is proposed that the constructed biotin-streptavidin labeling technology can achieve tracing of pathogenic bacteria and isolation of bacteria-containing phagosomes without affecting the biological characteristics and infectivity of pathogenic bacteria, and can be preliminarily applied to elucidate the molecular mechanisms of immune evasion by intracellular pathogenic bacteria. This study aims to verify this hypothesis and provide technical support for research on pathogen-host interactions. **Methods** ① *Burkholderia pseudomallei* (*B. p*), *Salmonella typhimurium* (*S. t*) and *Shigella flexneri* (*S. f*) were used as research objects, and J774A.1macrophages were employed to construct a bacteria-host cell infection interaction model. Biotin-streptavidin-labeled and unlabeled groups were established. Through covalent conjugation of NHS-biotin to amino groups on the bacterial membrane, a tracing system was constructed by coupling with streptavidin-FITC, or with streptavidin magnetic beads for magnetic sorting and isolation. ② Immunofluorescence assay was utilized to detect labeling efficiency and intracellular distribution. After the cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 1, 3, and 5 h respectively, cell infection rates, intracellular bacterial load per cell, and intracellular survival were compared. ③ ELISA was applied to detect the secretion levels of IL-1β, IL-12 and TNF-α in cell supernatants. ④ Furthermore, the cells were infected with magnetic bead-labeled bacteria, and bacteria-containing phagosomes were isolated by magnetic separation at 1 and 2 h or 3 and 5 h. Western blotting was performed to detect the expression of phagosome markers Rab5, Rab7, and LAMP-2, as well as the cytosolic internal reference GAPDH, to identify separation purity. ⑤ This technology was also applied to perform proteomic analysis of bacteria-containing phagosomes from wild-type *B. p* and *bopA* knockout strain (Δ*bopA*). **Results** The labeling efficiency of this labeling system for *B. p*, *S. t*, and *S. f* all reached above 90%, with uniform fluorescence signals and no non-specific adsorption. There were no significant differences between the labeled group and the unlabeled group in terms of cell infection rate, intracellular bacterial load per cell, intracellular survival trend and intracellular distribution patterns at 1, 3 and 5 h after infection ($P>0.05$). ELISA showed no statistically significant differences in the secretion levels of IL-1β, IL-12 and TNF-α between the 2 groups ($P>0.05$). In bacteria-containing phagosomes obtained by magnetic separation, the protein levels of Rab5, Rab7, and LAMP-2 were significantly higher than those in the cytosolic fractions ($P<0.05$), the level of cytoplasmic GAPDH contamination in phagosomes was extremely low. Proteomic analysis revealed that host proteins related to vesicle transport, including VAMP7, EEA1, RABEP1, and RAB3GAP2, were significantly upregulated in bacteria-containing phagosomes of the Δ*bopA* strain compared with the wild-type strain. **Conclusion** The biotin-streptavidin labeling and magnetic sorting system established in this study does not change the biological characteristics of pathogens, host cell infectivity, or the secretion of inflammatory factors. This system can accomplish fluorescent tracing of pathogenic bacteria and isolate high-purity bacteria-containing phagosomes, and be applied to preliminary elucidation of the potential mechanisms by which pathogen-related effector proteins mediate host defense evasion research.

[**Key words**] biotin-streptavidin; pathogen labeling; isolation of bacteria-containing phagosomes; anti-infective immunity

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (32300161) and the Project for New Chongqing Young Innovative Talents (CSTB2024NSCQ-QCXMX0055). Corresponding authors: Li Qian, E-mail: liqianjane@163.com

感染性疾病是全球公共卫生的重大威胁,其中胞内病原菌感染因其独特的致病机制成为临床治疗的难点[1]。这类病原菌不仅可侵入宿主细胞完成胞内定植与隐匿性增殖,借此逃逸免疫系统的识别与清除[2],还易形成持留感染灶,成为感染持续传播与复发的核心诱因。病原菌标记技术的发展与应用,为解析胞内病原菌的侵染、定植、免疫逃逸等关键机制以及实时追踪其胞内动态生命过程提供了技术支撑,为突破胞内病原菌感染的防控瓶颈奠定了研究基础[3]。

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. p*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S. t*)和福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*, *S. f*)是研究胞内感染病原致病机制的重要模式菌。这些病原体逃逸宿主免疫防御的核心机制在于对含菌吞噬体的精准调

控,使得病原菌能够劫持吞噬体微环境以有效逃逸宿主胞内免疫清除,达到持续存活的目的。因此,深入解析胞内感染病原菌免疫逃逸机制的前提是实现对胞内病原菌及含菌吞噬体的精准示踪与高纯度分离。近年来,生物素-链霉亲和素系统(biotin-streptavidin system, BSA)凭借优异的特异性及信号放大效应,为解决上述瓶颈提供了理想方案[4]。故本研究旨在构建基于生物素-链霉亲和素标记并分离含菌吞噬体的技术方法,为深入揭示胞内病原菌逃逸宿主细胞免疫清除的分子机制提供技术工具。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞及主要试剂

类鼻疽伯克霍尔德菌BPC006、类鼻疽伯克霍尔德菌*bopA*基因敲除株(Δ*bopA*株)、鼠伤寒沙门氏菌SL1344、福氏志贺氏菌2457T为本科室保藏菌种,J774A.1细胞为小鼠来源的单核-巨噬细胞系,是本科室保藏细胞株。兔抗*B. p*抗体由科室制备并保存。细菌染料购自碧云天公司,链霉亲和素-FITC购自Invitrogen公司,链霉亲和素磁珠试剂盒购自Invitrogen公司,IL-1β、IL-12和TNF-α ELISA检测试剂盒购自BioLegend公司,Rab5、Rab7、LAMP-2抗体购自CST公司,GAPDH抗体购自Bioss公司,DMEM培养基及胎牛血清购自Gibco公司,蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂购自雅酶公司,羊抗兔荧光二抗555、DAPI购自Thermo Fisher公司,生物素快速标记试剂盒、即用型微丝近红外荧光染色液、0.1% TritonX-100溶液购自碧云天公司。

1.2 主要仪器

BSD-160Ⅲ生物安全柜购自苏州安泰设备厂;恒温细胞培养箱购自四达试验设备厂;低温高速离心机、超低温冰箱购自Thermo Fisher Scientific公司;电泳仪、ChemiDoc Touch System购自Bio Rad公司;Leica SP8共聚焦显微镜购自Leica Microsystems公司。

1.3 病原菌的复苏与培养

-80 ℃低温冰箱中取出3种冻存菌种,*B. p*和*S. t*接种至LB固体培养基平板、*S. f*接种至TSB固体培养基平板,37 ℃恒温培养箱倒置培养。挑取形态均一的单菌落接种至5 mL LB液体培养基,37 ℃、200 r/min恒温摇床培养12 h制备活化菌液;将活化菌液转接至新鲜LB液体培养基,继续振荡培养至对数生长期[$OD_{(600)}$=0.6~0.8]。

1.4 生物素-链霉亲和素偶联FITC标记病原菌

在1 mL、$OD_{(600)}$=0.75的细菌悬液中加入500 μL 1 mol/L $NaHCO_3$与100 μL新鲜制备的10 mg/mL NHS-生物素溶液,吹打混匀,室温350 r/min振荡孵育2 h,15 000×*g*室温离心10 min,弃上清,1 mL无菌PBS重悬沉淀,室温离心10 min弃上清,重复3次彻底去除多余生物素,用1 mL无菌PBS重悬沉淀,加入70 μL 1 mg/mL链霉亲和素偶联FITC溶液,室温350 r/min避光振荡孵育1 h,8 000 r/min离心5 min收集细菌并弃去含上清,用PBS重悬细菌并重复离心洗涤2次去除游离荧光试剂,最终用500 μL无菌PBS重悬包被细菌,计数后于4 ℃保存备用。用于磁分选实验时,将生物素化细菌与链霉亲和素磁珠按试剂盒说明书及预实验优化条件孵育偶联,洗涤去除游离磁珠后重悬备用。

1.5 荧光涂片定量检测病原菌生物素标记效率

分别取生物素-链霉亲和素偶联FITC标记病原菌及未标记病原菌2 μL均匀滴加至载玻片上,稍晾干,滴加4%多聚甲醛固定10 min,盖上无菌盖玻片,使用倒置荧光显微镜对标记效率进行观察。标记效率=视野内双色荧光细菌数/视野内细菌总数×100%。每组随机选取至少5个独立视野进行计数。

1.6 建立病原菌感染梯度时相模型

根据实验设计需要将J774A.1细胞计数后铺板于相应规格培养皿或孔板中,对*B. p*、*S. t*、*S. f*进行生物素-链霉亲和素偶联FITC/磁珠标记后,测定病原菌$OD_{(600)}$,根据对应感染复数(multiplicity of infection, MOI)计算加入细胞培养皿中的病原菌体积,室温500×*g*对细胞培养皿离心4 min,使得病原菌与细胞均匀、充分接触。根据感染时间对细胞进行感染,收取对应样品。本研究以MOI=10感染J774A.1巨噬细胞,并按"原菌种类-是否标记-感染时间-取样类型"设计实验。①细胞感染实验:生物素-链霉亲和素标记组与未标记组分别感染*B. p*、*S. t*和*S. f*,感染后1、3、5 h收取细胞样品,用于感染率、胞内菌载量与胞内存活比较;②炎症因子分泌检测:以标记的*B. p*感染细胞,感染后3 h收取细胞上清,用于检测IL-1β、IL-12和TNF-α分泌水平;③含菌吞噬体分离:以标记菌感染细胞后分离吞噬体与胞质蛋白,其中*B. p*于感染后1、2 h收样,*S. t*与*S. f*于感染后3、5 h收样,所取样品类别为吞噬体/胞质蛋白,用于纯度鉴定;④吞噬体蛋白质组学分析:以*B. p*野生型与Δ*bopA*株感染细胞,感染后2 h分离吞噬体蛋白,用于蛋白质组学比较。

1.7 免疫荧光共定位检测病原菌胞内分布、细胞感染率与单细胞菌载量

收取对应感染时间的细胞样品,用PBS洗涤细胞

3次,4%多聚甲醛固定10 min,0.3% Triton X-100处理10 min,1% BSA封闭10 min。*B. p*组加入兔抗*B. p*抗体、羊抗兔荧光二抗分别于37 ℃避光孵育1 h,*S. t*组和*S. f*组加入BacLight™Bacterial Stains红色染料避光孵育3 h。PBS洗涤细胞后加入细胞微丝染液,室温避光孵育25 min。PBS洗涤细胞后加入DAPI,37 ℃避光孵育10 min。将细胞爬片倒置在滴有抗淬灭封片剂的载玻片上。使用Leica SP8共聚焦显微镜观察各组荧光情况。每个样本随机选取至少5个独立视野。结果判读标准:①细胞感染率=视野内含胞内病原菌的细胞数/视野内总细胞数×100%;②单细胞平均胞内菌数=视野内感染细胞中的病原菌总数/视野内感染细胞总数。

1.8 病原菌胞内存活能力检测

分别在感染不同时间点吸出相应细胞培养孔中的培养液,PBS洗涤3次,用1 mL 0.1% TritonX-100裂解细胞,室温静置5 min。吹打并吸出孔内破膜液移入96孔板,倍比稀释25、125倍,吸取10 μL液体滴加于干燥LB方形平板上,每个稀释度设置5个复孔。置于37 ℃细菌培养箱培养36 h后记录平板上菌落数量。根据各菌感染率、接种细胞数、取样分数和稀释倍数,计算平均每个细胞内细菌数量。

1.9 ELISA检测感染细胞炎症因子分泌水平

采用双抗体夹心法对IL-1β、IL-12和TNF-α进行检测。向ELISA酶标板每孔加100 μL稀释后捕获抗体,4 ℃孵育过夜,洗涤缓冲液洗涤后,每孔加200 μL 1×Assay Diluent A室温振荡封闭1 h并再次洗涤;随后每孔加100 μL稀释后的标准品或待测样本,密封后室温振荡孵育2 h;洗涤后每孔加100 μL稀释后检测抗体,密封室温振荡孵育1 h并洗涤,每孔加100 μL稀释后的Avidin-HRP溶液,密封室温振荡孵育30 min,洗涤缓冲液洗涤后,每孔加100 μL TMB底物,避光室温孵育20 min,每孔加100 μL终止液,用酶标仪读取$OD_{(450)}$。

1.10 生物素-链霉亲和素偶联磁珠分选含菌吞噬体

J774A.1细胞铺板于6 cm细胞培养皿中,以MOI=10加入生物素-链霉亲和素偶联磁珠标记病原菌感染细胞。到达感染时间后弃去培养基,用室温PBS洗涤细胞。在使用前向吞噬体分离缓冲液A中立即加入终浓度为1 mmol/L的DTT和10 μmol/L的细胞松弛素B以及蛋白酶、磷酸酶抑制剂。每皿加入0.75 mL预冷的吞噬体分离缓冲液A,冰浴20 min;再加入0.25 mL预冷吞噬体分离缓冲液B,用细胞刮收集细胞。用1 mL注射器接26G针头反复抽打细胞悬液并通过显微镜观察细胞破碎率。将细胞裂解液置于磁力架上静置5 min,收集吸附在管壁上的含菌吞噬体。上清液转移至另一管,用1 mL PBS重悬洗涤3次,收集沉淀为胞质组分物质。4 ℃保存备用。

1.11 Western blotting检测吞噬体标志物及鉴定吞噬体纯度

将分离得到的含菌吞噬体和胞质组分加入5× Loading Buffer,金属浴95 ℃煮10 min,根据实验需求每孔10 μL上样至10% SDS-PAGE凝胶中进行恒压200 V电泳1 h,恒流300 mA的条件下进行转膜90 min,PVDF膜置于封闭液中封闭1 h,根据检测指标加入Rab5、Rab7、LAMP-2、GAPDH抗体4 ℃孵育过夜。TBST洗膜后加入相应属种的二抗室温孵育1.5 h,TBST洗膜后使用Bio-Rad化学发光仪观察蛋白条带。

1.12 含菌吞噬体蛋白组质谱差异筛选实验

将对数生长期的*B. p*野生型和Δ*bopA*株进行生物素-链霉亲和素偶联磁珠标记,以MOI=10对J774A.1细胞进行感染,参照1.10的方法,分离感染后细胞中的含菌吞噬体;将洗脱得到的2组吞噬体样品进行SDS-PAGE浅层电泳分离约1 cm,切取包含全部吞噬体蛋白的泳道胶条,经胶内酶解、肽段提取与纯化后,上样至高效液相色谱-质谱联用仪进行检测。

1.13 统计学分析

各实验均进行至少3次独立重复,使用GraphPad Prism软件进行Student's *t*检验和单因素方差分析(ANOVA),分析定量结果统计学差异并作图,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建生物素-链霉亲和素病原菌荧光标记与含菌吞噬体磁分选技术体系

以病原菌细胞膜表面的氨基(-NH_2)为作用靶点,通过生物素与细胞膜成分共价结合实现病原菌的特异性修饰。本实验以*B. p*、*S. t*、*S. f*为代表菌种,利用生物素的羧基与细菌细胞膜表面的氨基发生酰胺化反应,形成稳定的生物素-细菌复合物(biotin-bacteria);然后去除未结合的游离生物素,加入链霉亲和素,利用链霉亲和素与生物素的特异性结合,使荧光探针通过链霉亲和素桥联作用偶联至病原菌表面(图1A)。

基于病原菌感染宿主细胞后形成含菌吞噬体(bacteria within phagosome)以及磁珠偶联链霉亲和素(streptavidin magnetic beads)与含菌吞噬体内病原菌表面生物素发生特异性结合的特性,通过磁分选技术

实现特异性富集,形成“含菌吞噬体-生物素-链霉亲和素-磁珠”复合物,进一步去除胞质组分,最终得到纯度高的含菌吞噬体(图1B)。

2.2 生物素-链霉亲和素荧光探针可高效率标记胞内病原菌,荧光信号均一

在单独菌体涂片及感染细胞样本中,*B. p*、*S. t*、*S. f*未标记组仅能观察到红色荧光,未检测到特异性生物素-链霉亲和素偶联荧光信号;而标记组细菌同时呈现红色荧光与特异性生物素-链霉亲和素偶联荧光信号,且2种荧光信号高度共定位(图2A~D)。统计结果显示,*B. p*、*S. t*、*S. f*的标记效率均可达到90%以上(图2E)。此外,所有标记菌株的荧光信号强度均一,且无明显强弱不均现象,表明生物素在细菌细胞膜表面的结合具有良好均一性。上述结果显示,优化后的生物素-链霉亲和素荧光标记体系对*B. p*、*S. t*、*S. f*均具有高效、特异的标记效果,且稳定性良好,可满足后续病原菌感染追踪及含菌吞噬体分离等实验需求。

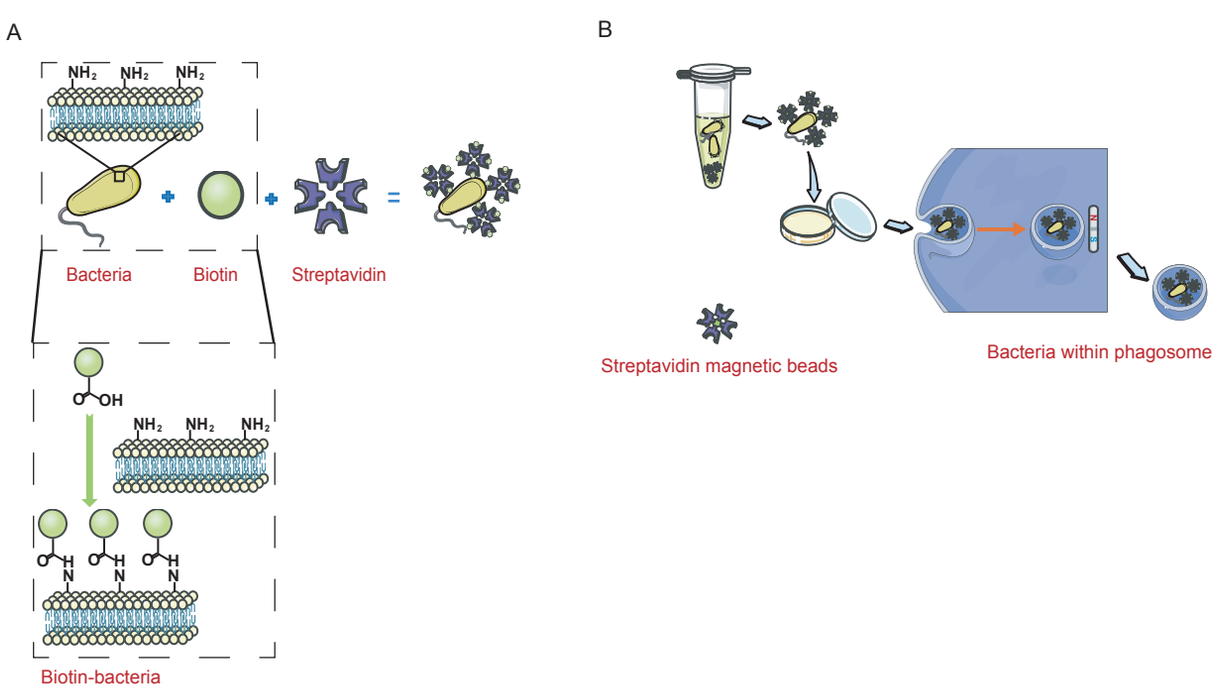
2.3 生物素-链霉亲和素荧光标记不改变病原菌感染效率、胞内存活与胞内分布

定量结果显示,在细胞感染率层面,*B. p*、*S. t*、*S. f*的标记组与未标记组在感染1、3、5 h时,含菌细胞占总细胞的比例均无统计学差异($P>0.05$),提示生物素标记不影响病原菌侵袭宿主细胞的细胞覆盖度(图3A~C)。在胞内菌载量层面,共聚焦下单细胞平均菌数统计显示,感染初期(1 h),2组病原菌的胞内菌数无显著差异,说明标记修饰不影响病原菌的黏附与入侵能力;随感染进程延长至3、5 h,2组的单细胞菌载量仍保持一致,表明标记修饰不改变病原菌的胞内增殖能力(图3D~F)。同时,胞内生存实验结果也验证了上述结论(图3G)。

镜下观察结果显示,标记病原菌感染细胞后,胞内可检测到清晰的特异性荧光信号,标记菌定位模式与未标记病原菌无明显差异。未观察到标记组出现病原菌黏附异常、胞内异常聚集或侵袭障碍等现象,表明标记修饰未改变病原菌与宿主细胞的相互作用模式及胞内分布规律(图3H)。

2.4 生物素-链霉亲和素标记技术不影响炎症因子的分泌水平

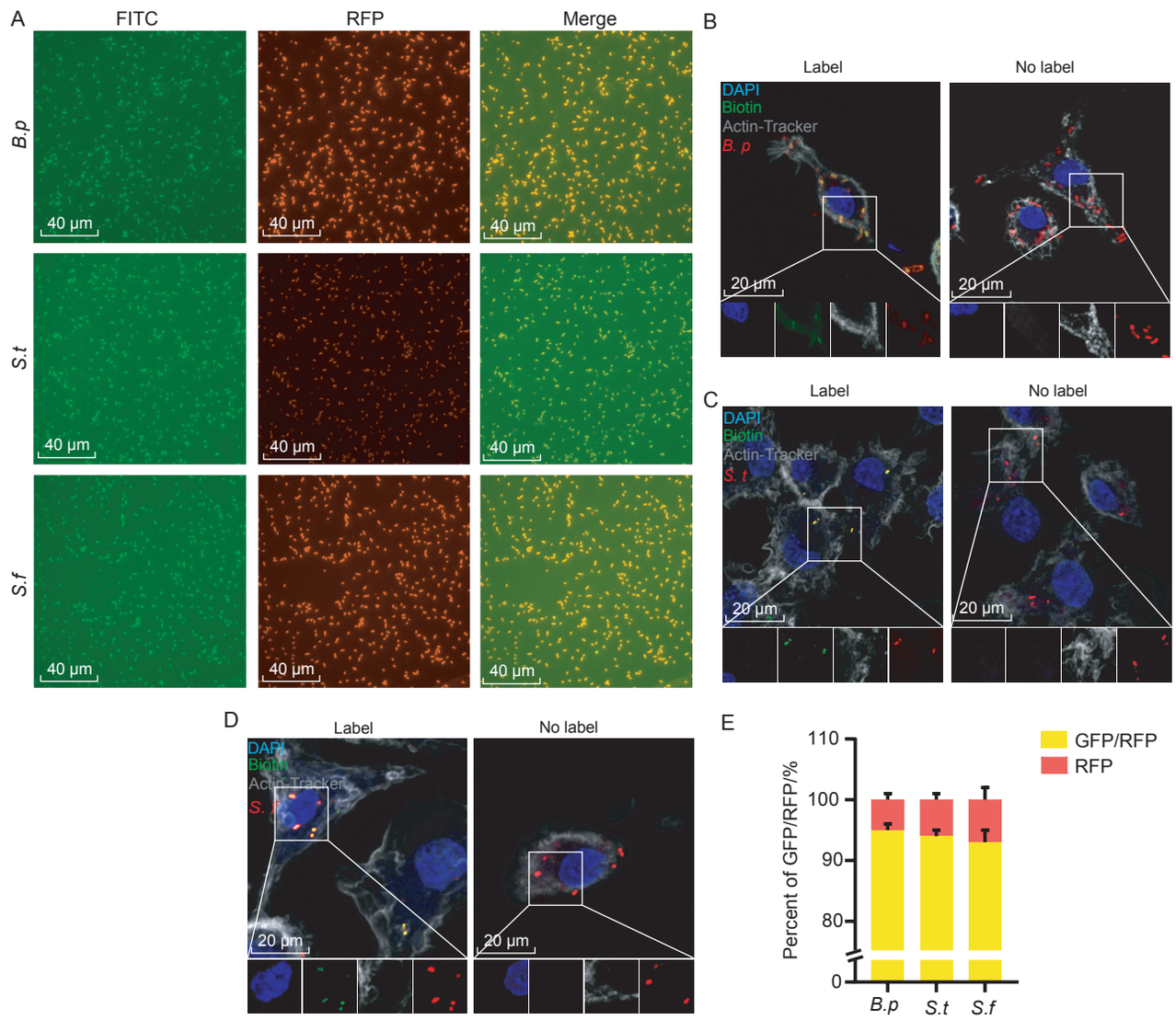
在*B. p*、*S. t*、*S. f*感染体系中,未标记菌感染组与标记菌感染组IL-1β、IL-12和TNF-α的分泌水平无显著差异,且感染组均显著高于未感染组的炎症因子表达($P<0.05$,图4A~C)。上述结果表明,生物素-链霉亲和素标记过程不改变病原菌的毒力,确保了基于生物素-链霉亲和素标记病原菌的实验结果能真实反映病



A: Schematic diagram of the biotin-streptavidinized pathogen; B: Schematic representation of the isolation of bacteria-containing phagosomes by biotin-streptavidin magnetic beads

图1 生物素-链霉亲和素标记细菌及偶联磁珠分离含菌吞噬体的流程

Figure 1 Procedure of biotin-streptavidin labeling of bacteria and separation of phagosomes containing bacteria by biotin-streptavidin magnetic beads



A: Representative images of immunofluorescence staining showing the labeling efficiencies of *B. p*, *S. t* and *S. f*; B to E: Representative images of immunofluorescence staining showing the labeling efficiencies of *B. p* (B), *S. t* (C) and *S. f* (D) under infection conditions and statistical analysis of labeling efficiency (E)

图2 生物素-链霉亲和素荧光探针标记病原菌效率分析

Figure 2 Analysis of the efficiency of biotin-streptavidin fluorescent probe labeling pathogenic bacteria

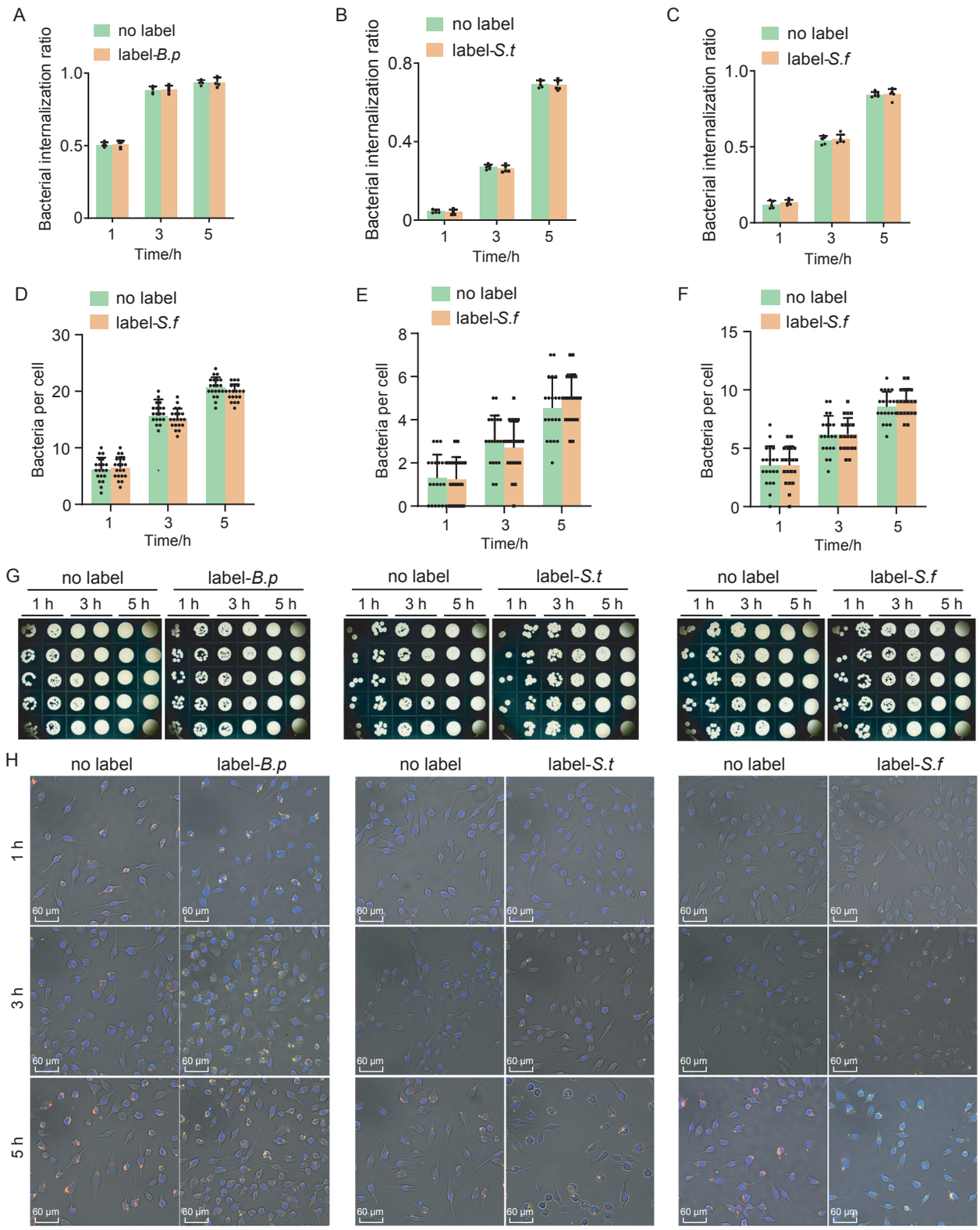
原菌的感染状态。

2.5 含菌吞噬体分离效果可靠且保留特征性标志蛋白

在*B. p*感染体系中,感染后1、2 h分离的含菌吞噬体组分均能清晰、高丰度检测到含菌吞噬体特征性标记Rab5、Rab7及LAMP-2的蛋白条带,而胞质组分的相应标记蛋白表达水平则明显低于含菌吞噬体组分(图5A)。在*S. t*和*S. f*感染体系中,感染后3、5 h分离的含菌吞噬体组分比胞质组分更多地富集了Rab5、Rab7、LAMP-2蛋白(图5B、C)。此外,吞噬体分离组分中胞质内参蛋白GAPDH条带信号微弱,表明分离物中胞质污染程度低,说明本实验中基于磁珠偶联的生物素-链霉亲和素标记的含菌吞噬体的分离效果可靠,纯度高、胞质污染少,且能有效保留吞噬体膜的特征性标志蛋白,为后续含菌吞噬体相关蛋白组学分析及病原菌胞内生存机制研究提供高质量的实验材料。

2.6 Δ*bopA*株含菌吞噬体中囊泡转运相关宿主蛋白上调

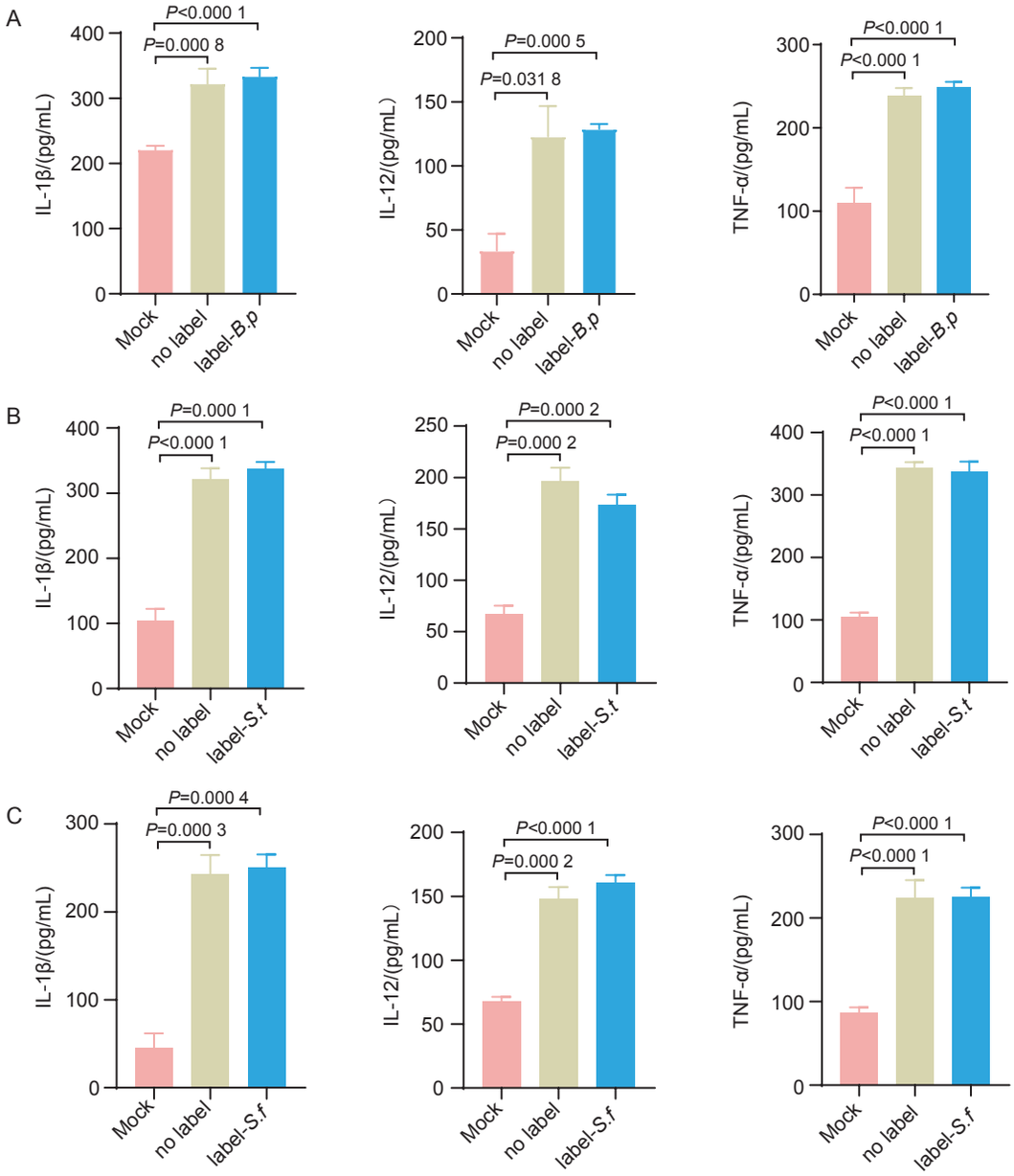
蛋白质谱分析结果显示,与*B. p*野生株相比,从Δ*bopA*株含菌吞噬体中筛选出多个上调蛋白。其中,SNARE家族蛋白VAMP7、早期吞噬体标志性蛋白EEA1、Rab效应蛋白RABEP1和Rab3 GTP酶激活蛋白RAB3GAP2在火山图中均呈现明显的右上侧富集特



A to C: Statistical analysis of the proportion of cells entered by labelled/unlabeled *B. p* (A), *S. t* (B) and *S. f* (C) at different stages of infection; D to F: Statistical analysis of labeled/unlabeled *B. p* (D), *S. t* (E) and *S. f* (F) in individual cells at different infection stages; G: Colony formation of labeled/unlabeled *B. p* (left), *S. t* (middle) and *S. f* (right) at different infection stages to reflect their survival status; H: Microscopic view of labeled/unlabeled *B. p* (left), *S. t* (middle) and *S. f* (right) infected cells at different infection stages

图3 生物素-链霉亲和素荧光探针标记病原菌感染效率检测

Figure 3 Efficiency of biotin-streptavidin fluorescent probe labeled pathogen infection



A to C: Expression levels of IL-1β, IL-12, and TNF-α in labeled/unlabeled *B. p* (A), *S. t* (B) *and S. f* (C) by ELISA

图4 生物素-链霉亲和素标记病原菌对感染宿主细胞诱导炎症因子表达的影响

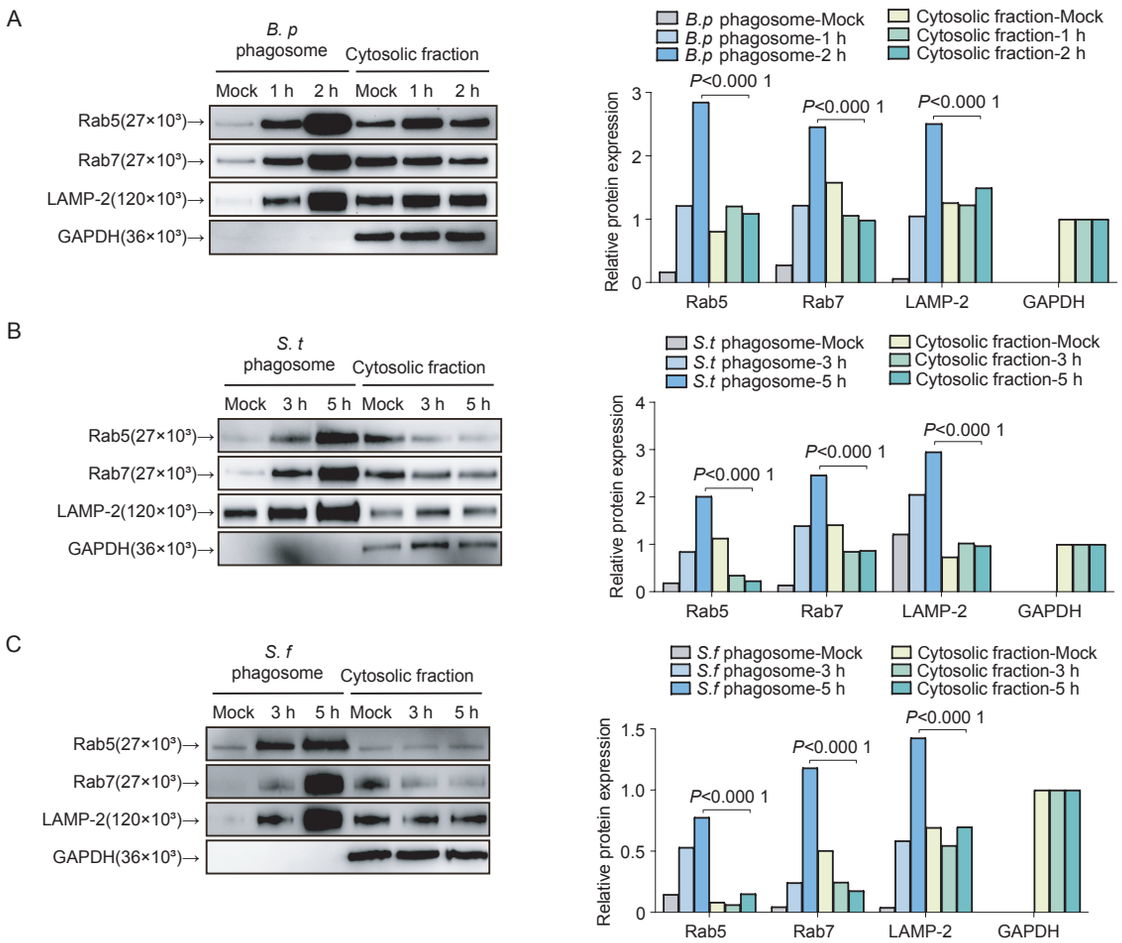
Figure 4 Effect of biotin-streptavidin-labeled pathogens on the expression of inflammatory factors induced by infected host cells

征(图6),提示*B. p*可能通过效应蛋白BopA影响蛋白VAMP7、EEA1、RABEP1或RAB3GAP2的招募或功能,进而调控含菌吞噬体转运成熟过程,介导细菌从含菌吞噬体内的逃逸。

3 讨论

3.1 生物素-链霉亲和素标记体系兼具高效性与低生物干扰性

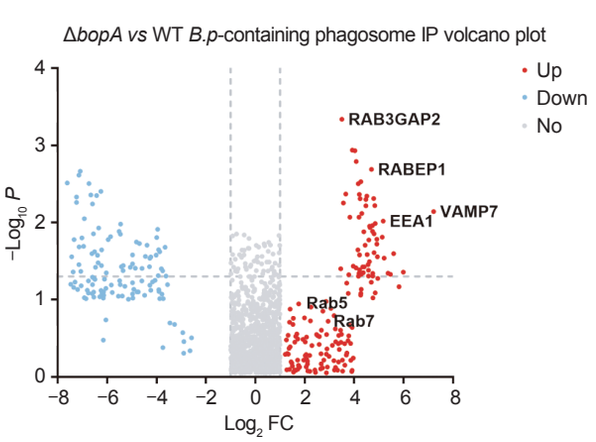
近年来,随着生物技术的不断发展,标记方法和技术更新迭代迅速,而传统的标记与分离技术由于存在明显局限,如荧光蛋白标记往往会改变病原菌的生物学特性,且易受胞内环境干扰导致信噪比下降[8-10];传统密度梯度离心法在分离吞噬体时难以平衡纯度与回收率[11],机械剪切力易导致吞噬体结构破损[12],无法真实还原病原感染宿主时的天然微环境等,故无法对病原微生物逃逸宿主防御网络的机制进行准确解析。本研究采用的表面修饰标记方式以细菌细胞膜固有基团为作用靶点,无需引入外源基因,避免了基因编辑对病原菌基因组的干扰,同时生物素分子体积小,其与细胞膜的共价结合不改变细菌表面关键结



A to C: Expression levels and statistical analysis of classical markers in phagosomes containing *B. p* (A), *S. t* (B) and *S. f* (C) and in cytosolic fractions by Western blotting

图5 生物素-链霉亲和素偶联磁珠标记的含菌吞噬体分离效果检测

Figure 5 Isolation of bacteria-containing phagosomes labeled with biotin-streptavidin magnetic beads



UP: Significantly upregulated proteins in phagosomes of Δ*bopA* strain; DOWN: Significantly downregulated proteins in Δ*bopA* phagosomes; NO: No statistically significant difference between the 2 groups. WT: wild-type *B. p*; Δ*bopA*: *bopA* knockout strain of *B. p*

图6 *B. p* Δb*opA* 与WT含菌吞噬体蛋白质组差异表达火山图

Figure 6 Volcano plot of differentially expressed phagosomal proteome between Δ*bopA* and WT *B. p*

构特征是该体系实现高效标记的重要原因。链霉亲和素的四价结合特性实现了荧光信号的多级放大,使标记病原菌的荧光信号强度稳定,可满足低侵染率样本中病原菌的示踪与定量需求,有效解决了传统标记技术中胞内信号淬灭、背景干扰导致的成像信噪比低的问题[13]。

3.2 含菌吞噬体蛋白组学分析提示BopA调控的宿主免疫逃逸候选机制

3.2.1 生物素-链霉亲和素分离体系提升吞噬体蛋白组解析可靠性 本研究建立的生物素-链霉亲和素介导的含菌吞噬体分离技术,为解析病原菌相关效应蛋白介导的宿主防御逃逸机制提供了技术支撑[14-15]。该技术提高了吞噬体蛋白纯度,使筛选得到的差异蛋白更具吞噬体微环境特异性,实现了宿主信号分子-病原菌效应蛋白之间的初步探索。

3.2.2 囊泡相关宿主蛋白参与调控吞噬体,含菌吞

噬体蛋白组学揭示BopA潜在作用通路　　胞内病原微生物独特的感染特性是其产生致病作用的重要因素。已有研究显示,*B. p*利用其高度保守的Ⅲ型和Ⅵ型分泌系统介导吞噬体逃逸与胞内增殖[16],*S. t*通过SPI-1与SPI-2致病岛调控吞噬体成熟以实现胞内定植[17],*S. f*则依靠极强的侵袭能力在胞内扩散并逃避溶酶体杀伤[18-19],这些机制使得病原菌能够调控宿主细胞内吞噬体微环境,避开宿主清除并在胞内存活。

根据研究报道,Ⅲ型分泌系统效应蛋白BopA是*B. p*的关键毒力因子,其基因组定位于*Bsa*基因簇(BPSS1516-BPSS1554区域)内,与其他效应蛋白BopE、BipD等基因分布相邻[20]。*B. p* BopA在其逃逸宿主的免疫清除中发挥重要调控作用,但机制尚未解析[21-22]。进一步结合结构预测分析,发现BopA及其同源蛋白含有的Rho GTPase失活结构域、胆固醇结合结构域及LC3相互作用区域等,分别通过干扰宿主细胞信号通路、改变吞噬体膜组成、直接结合LC3等方式帮助其免疫逃逸[23-24],提示BopA是*B. p*实现细胞内生存、逃避宿主免疫防御的核心因子。通过本研究中生物素-链霉亲和素标记技术的建立和吞噬体蛋白质组学的质谱鉴定,发现*B. p* BopA可能通过影响宿主细胞吞噬体相关蛋白VAMP7、EEA1、RABEP1、RAB3GAP2等的招募或者功能,进而调控宿主细胞的胞内免疫清除反应,但具体分子机制还需要进一步探索。

研究显示,本实验中发现的以上蛋白在调控病原菌逃逸以及维持宿主防御中具有重要作用,如*S. t*含菌空泡与VAMP7阳性溶酶体样囊泡相互作用,促进其在晚期含菌空泡内的生长[25]、VAMP7参与幽门螺杆菌VacA诱导的胃上皮细胞空泡化,促进病原菌的细胞毒性作用和逃逸[26],这些机制共同导致吞噬体膜结构障碍,最终引发膜破损帮助病原菌逃逸宿主防御。

EEA1是早期吞噬体膜核心支架蛋白,病原菌通过竞争性抑制,阻滞早期吞噬体向晚期吞噬体转化。如结核分枝杆菌ManLAM糖脂阻止EEA1与Rab7募集,维持早期吞噬体特性,抑制膜成熟与酸化[27];嗜肺军团菌Dot/Icm效应蛋白干扰EEA1-Rab5相互作用,阻断膜组分更替[28]。

RABEP1作为Rab5核心效应蛋白辅助EEA1膜更新,调控吞噬体囊泡运输、膜重塑及正常成熟进程[28];维持吞噬体膜结构完整与膜修复能力,促进吞噬体与溶酶体有序融合,介导胞内病原菌降解和清除[29]。

RAB3GAP2作为Rab3 GTP酶激活蛋白与RAB3GAP1结合形成功能异二聚体[30],调控Rab3/Rab18酶活性参与吞噬体膜损伤修复、膜脂质补充及自噬体-溶酶体融合等过程[31]。同时调控免疫囊泡分泌与自噬介导的病原清除通路,从膜稳态、囊泡运输和自噬防御等多层面发挥宿主抗胞内病原菌免疫防御功能。

因此,本研究基于生物素-链霉亲和素含菌吞噬体分离技术获取结构完整含菌吞噬体,以期在真实吞噬体微环境中解析BopA与宿主分子的互作及上下游调控关系,阐明*B. p*通过BopA调控吞噬体蛋白实现免疫逃逸的分子网络。同时该技术可拓展至其他胞内病原菌的逃逸机制研究,结合组学分析能够系统解析病原菌调控吞噬体微环境并实现免疫逃逸的分子机制,为研发靶向病原菌逃逸关键靶点药物提供了新思路方法。

3.3　本研究的局限性

本研究构建的生物素-链霉亲和素偶联荧光/磁珠的双标记体系,既保持了病原菌的毒力特性,又实现了高标记效率、低生物干扰性及分离高特异性的优势效果,但仍存在一定的局限性。①在标记体系方面,本研究仅验证了该技术对3种致病菌的标记效果,对于病毒、真菌、寄生虫等其他胞内病原体,由于其细胞壁结构与细胞膜表面基团组成存在差异,标记效率及生物干扰性仍需进一步验证;②在分离体系方面,本研究虽实现了不同成熟阶段含菌吞噬体的初步分离,但未对含菌吞噬体的微环境特征进行进一步解析;③目前蛋白质组学筛选出的VAMP7、EEA1、RABEP1、RAB3GAP2尚未通过Western blotting、免疫荧光共定位、敲低/过表达或功能拯救实验验证,因此只能作为候选分子机制;④本研究的实验验证均在体外细胞模型中完成,该技术在动物体内感染模型中的标记稳定性及含菌吞噬体的体内分离效果,仍需后续进一步探索。

综上,本研究构建的生物素-链霉亲和素标记技术有效解决了传统病原菌标记与含菌吞噬体分离技术中的特异性不足、生物干扰性强、分离产物纯度低且完整性差等核心问题,实现了病原菌的高效标记及含菌吞噬体的高纯度分离,为病原菌的感染追踪、胞内定位、病原菌-宿主互作以及逃逸免疫防御机制研究提供了可靠的技术手段。

利益冲突　本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Bertagnolio S, Dobreva Z, Centner C M, *et al*. WHO global research priorities for antimicrobial resistance in human

health[J]. Lancet Microbe, 2024, 5(11): 100902. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00134-4.

[2] Thakur A, Mikkelsen H, Jungersen G. Intracellular pathogens: host immunity and microbial persistence strategies [J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 1356540. DOI: 10.1155/2019/1356540.

[3] Singh M K, Kenney L J. Visualizing the invisible: novel approaches to visualizing bacterial proteins and host-pathogen interactions [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2024, 12: 1334503. DOI: 10.3389/fbioe.2024.1334503.

[4] 卢菲, 郝润霞, 祝晨辰, 等. 磁珠纳米探针结合免疫层析法联级信号放大快速检测奶制品中的两种致病菌[J]. 微生物前沿, 2023, 12(2): 94-102. DOI: 10.12677/AMB.2023.122011.
Lu F, Hao R X, Zhu C C, *et al*. Cascade signal amplification rapid detection of two pathogenic bacteria in dairy products using magnetic bead nanoprobes combined with immunochromatographic[J]. Adv Microbiol, 2023, 12(2): 94-102. DOI: 10.12677/AMB.2023.122011.

[5] Whiteley L, Meffert T, Haug M, *et al*. Entry, intracellular survival, and multinucleated-giant-cell-forming activity of *Burkholderia pseudomallei* in human primary phagocytic and nonphagocytic cells [J]. Infect Immun, 2017, 85(10): e00468-e00417. DOI: 10.1128/IAI.00468-17.

[6] Sharma A, Puhar A. Gentamicin protection assay to determine the number of intracellular bacteria during infection of human TC7 intestinal epithelial cells by *Shigella flexneri* [J]. Bio Protoc, 2019, 9(13): e3292. DOI: 10.21769/BioProtoc.3292.

[7] Knodler L A, Nair V, Steele-Mortimer O. Quantitative assessment of cytosolic *Salmonella* in epithelial cells [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84681. DOI: 10.1371/journal.pone.0084681.

[8] Branon T C, Bosch J A, Sanchez A D, *et al*. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(9): 880-887. DOI: 10.1038/nbt.4201.

[9] 陈雅婷, 卢向阳, 肖桂青. 邻近标记技术在核酸—蛋白互作中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(9): 3124-3130. DOI: 10.13417/j.gab.040.003124.
Chen Y T, Lu X Y, Xiao G Q. The research of proximity labeling technique in interaction between nucleic acid and protein[J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(9): 3124-3130. DOI: 10.13417/j.gab.040.003124.

[10] Chalmoukis C, Droubogiannis S, Michalopoulou V A, *et al*. Development and characterization of fluorescent protein-tagged *Vibrio harveyi* strains as a versatile tool for studying infection dynamics and strain interactions[J]. Pathogens, 2025, 14(3): 247. DOI: 10.3390/pathogens14030247.

[11] 张峻豪, 匡磊, 雷镒妃, 等. 免疫磁性分离技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(5): 2219-2227. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2024.05.042.
Zhang J H, Kuang L, Lei Y F, *et al*. Application of immunomagnetic separation technology in the detection of pathogenic microorganisms[J]. China Anim Husb Vet Med, 2024, 51(5): 2219-2227. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2024.05.042.

[12] Singh V, Schwerk P, Tedin K. Rapid Isolation of intact *Salmonella*-containing vacuoles using paramagnetic nanoparticles[J]. Gut Pathog, 2018, 10: 33. DOI: 10.1186/s13099-018-0256-7.

[13] Zheng Y F, Jiang M Y, Zhu X Y, *et al*. Metabolic labeling-mediated visualization, capture, and inactivation of Gram-positive bacteria *via* biotin-streptavidin interactions [J]. Chem Commun, 2024, 60(27): 3697-3700. DOI: 10.1039/d4cc00517a.

[14] Gong L, Cullinane M, Treerat P, *et al*. The *Burkholderia pseudomallei* type Ⅲ secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17852. DOI: 10.1371/journal.pone.0017852.

[15] Yu D, Yin Z Q, Jin Y, *et al*. Evolution of*bopA* gene in *Burkholderia*: a case of convergent evolution as a mechanism for bacterial autophagy evasion[J]. BioMed Res Int, 2016, 2016: 6745028. DOI: 10.1155/2016/6745028.

[16] Bzdyl N M, Moran C L, Bendo J, *et al*. Pathogenicity and virulence of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Virulence, 2022, 13(1): 2139063. DOI: 10.1080/21505594.2022.2139063.

[17] Cameron A D S, Dorman C J. A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of *Salmonella* pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2[J]. PLoS Genet, 2012, 8(3): e1002615. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002615.

[18] Pakbin B, Brück W M, Brück T B. Molecular mechanisms of *Shigella* pathogenesis; recent advances[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2448. DOI: 10.3390/ijms24032448.

[19] 宋承润, 陈恩强.《细菌性痢疾诊疗方案(2023年版)》解读[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(7): 743-748. DOI: 10.13461/j.cnki.cja.007715.
Song C R, Chen E Q. Interpretation of diagnosis and treatment plan for bacterial dysentery (2023 edition)[J]. Chin J Antibiot, 2024, 49(7): 743-748. DOI: 10.13461/j.cnki.cja.007715.

[20] Vander Broek C W, Stevens J M. Type Ⅲ secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* [J]. Front

Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 255. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00255.

[21] Mariappan V, Vellasamy K M, Barathan M, *et al*. Hijacking of the host's immune surveillance radars by *Burkholderia pseudomallei*[J]. Front Immunol, 2021, 12: 718719. DOI:10.3389/fimmu.2021.718719.

[22] Allwood E M, Devenish R J, Prescott M, *et al*. Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*[J]. Front Microbiol, 2011, 2(AUG): 170.

[23] Kayath C A, Hussey S, El hajjami N, *et al*. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy requires binding to cholesterol through the type Ⅲ effector, IcsB[J]. Microbes Infect, 2010, 12 (12/13): 956-966. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.06.006.

[24] Pei J M, Grishin N V. The Rho GTPase inactivation domain in *Vibrio cholerae* MARTX toxin has a circularly permuted papain-like thiol protease fold[J]. Proteins, 2009, 77(2): 413-419. DOI:10.1002/prot.22447.

[25] Santos J C, Duchateau M, Fredlund J, *et al*. The COPII complex and lysosomal VAMP7 determine intracellular *Salmonella* localization and growth [J]. Cell Microbiol, 2015, 17(12): 1699-1720. DOI:10.1111/cmi.12475.

[26] Mashima H, Suzuki J, Hirayama T, *et al*. Involvement of vesicle-associated membrane protein 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori*-produced VacA[J]. Infect Immun, 2008, 76(6): 2296-2303. DOI:10.1128/iai.01573-07.

[27] Fratti R A, Chua J, Deretic V. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46961-46967. DOI: 10.1074/jbc.M305225200.

[28] Spanò S, Galán J E. Taking control: Hijacking of Rab GTPases by intracellular bacterial pathogens [J]. Small GTPases, 2018, 9(1-2): 182-191. DOI:10.1080/21541248.2017.1336192.

[29] Millarte V, Spiess M. RABEP1/Rabaptin5: a link between autophagy and early endosome homeostasis[J]. Autophagy, 2022, 18 (3): 698-699. DOI: 10.1080/15548627.2021.2021497.

[30] Spang N, Feldmann A, Huesmann H, *et al*. RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy [J]. Autophagy, 2014, 10 (12): 2297-2309. DOI:10.4161/15548627.2014.994359.

[31] Fairlie G M J, Nguyen K M, Nam S E, *et al*. Biochemical and structural characterization of Rab3GAP reveals insights into Rab18 nucleotide exchange activity[J]. Nat Commun, 2025, 16: 479. DOI:10.1038/s41467-025-55828-8.

(收稿:2026-05-25;修回:2026-07-03)

(编辑 汤锦波)