

两种降解策略下ZIF-8对副溶血性弧菌的保护作用比较

韩迎珊, 袁诗, 汪琦, 冯昊, 冯佳琦, 夏万全, 王文彬*
(江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005)

摘要:为解决革兰氏阴性菌表面蛋白组分析中存在细胞壁薄、胞内蛋白易渗漏的问题,使用不同降解程度的沸石咪唑框架-8(ZIF-8)作为活细胞的多孔保护外骨骼,来维持细胞在胁迫环境下的形态和生理活性。该研究通过优化的“一锅法”,采用乙酸锌和二甲基咪唑在副溶血性弧菌(VP)表面合成ZIF-8保护壳,并比较了酸性PBS法和EDTA法对ZIF-8的降解动力学,开发了一种快速可控的ZIF-8降解和分析方法。扫描电镜(SEM)、能量色散X射光谱(EDS)表明ZIF-8对副溶血性弧菌的包裹率为99.99%,pH值为5.0的PBS可在30 min内对ZIF-8保护壳实现可控降解,最大降解率为80.83%,而50 mmol·L⁻¹ EDTA可在15 min内实现降解,最大降解率为96.00%。溶菌酶消化、纯水处理后显微镜观察表明包裹及EDTA和PBS降解后菌体在溶菌酶和低渗透压环境下均可保持细胞完整性,BCA蛋白定量表明包裹及PBS和EDTA降解后胞内蛋白的渗漏分别减少了95.16%和94.47%。综上,ZIF-8包裹和可控降解后可作为副溶血性弧菌的外骨骼,可有效保护细胞形态,减少胞内蛋白渗漏,为促进表面蛋白组分析在免疫检测靶点发掘和疫苗的开发提供了参考。

关键词: 仿生矿化; ZIF-8; 表面蛋白组; 细胞保护壳; 蛋白渗漏; 快速降解

文章编号: 1673-9078(2026)03-75-82 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1798

Comparison of the Protective Effects of ZIF-8 on *Vibrio parahaemolyticus* with Two Different Degradation Strategies

HAN Yingshan, YUAN Shi, WANG Qi, FENG Hao, FENG Jiaqi, XIA Wanquan, WANG Wenbin*
(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biological Resources and Environment, Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, College of Marine Food and Biological Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: To develop an effective surface proteomic profiling method for Gram-negative bacteria, whose thin cell walls make them prone to cytoplasmic protein leakage, Zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) with varying degrees of degradation was used as a porous protective exoskeleton for live cells, thereby helping maintain cell morphology and physiological activity under stressful conditions. We optimized a one-pot method to synthesize ZIF-8 protective shells onto the *Vibrio parahaemolyticus* (VP) surface using zinc acetate and dimethyl imidazole and characterized ZIF-8 degradation kinetics under acidic PBS or EDTA treatment. A

引文格式:

韩迎珊,袁诗,汪琦,等.两种降解策略下ZIF-8对副溶血性弧菌的保护作用比较[J].现代食品科技,2026,42(3):75-82.

HAN Yingshan, YUAN Shi, WANG Qi, et al. Comparison of the protective effects of ZIF-8 on *Vibrio parahaemolyticus* with two different degradation strategies [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 75-82.

收稿日期: 2024-12-02; 修回日期: 2025-02-15; 接受日期: 2025-02-26
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172284); 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(21KJB550002); 江苏省博士后科研资助基金(2021K316C)
作者简介: 韩迎珊(1999-),女,硕士研究生,研究方向:食品微生物检测, E-mail: hanyingshan123@163.com
通讯作者: 王文彬(1990-),男,博士,副教授,研究方向:微生物检测与控制研究, E-mail: wenbin66@jou.edu.cn

rapid and controllable method for ZIF-8 degradation and analysis was developed. Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) revealed 99.99% VP encapsulation efficiency by ZIF-8. PBS at pH 5.0 could achieve controlled degradation of the ZIF-8 protective shell in 30 minutes, with a maximum degradation rate of 80.83%. In contrast, 50 mmol·L⁻¹ EDTA could degrade the shell in 15 minutes, with a maximum degradation rate of 96.00%. Observation via microscopy after lysozyme digestion and ultrapure water treatment showed that cells encapsulated with ZIF-8 and subsequently degraded by EDTA or PBS could maintain cell integrity in lysozyme-treated and low osmotic pressure environments. BCA protein quantification showed that cytoplasmic protein leakage reduced by 95.16% and 94.47% after ZIF-8 encapsulation and degradation by PBS or EDTA, respectively. ZIF-8 encapsulation followed by controlled degradation creates an exoskeleton for *Vibrio parahaemolyticus*, effectively protecting cell morphology and reducing cytoplasmic protein leakage. These findings provide a reference method to facilitate application of surface proteome analysis for discovery of immune detection targets and vaccine development.

Key words: biomimetic mineralization; ZIF-8; surface proteome; protective shell for cells; protein leakage; rapid degradation

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种嗜盐性食源性致病菌和重要的鱼虾病害菌, 广泛存在于海产品中, 通过食用未煮熟或交叉污染的海产品引起呕吐、腹泻等食物中毒症状, 严重威胁食品安全与公共健康^[1-5]。在一项对我国 15 个省 905 份样品的研究报告中, 鱼类样本中 VP 的检出率 14.17%, 虾类样本检出率 15.34%, 即食食品样本检出率 3.67%^[6,7]。VP 通过形成生物膜增强其致病性和耐药性, 使其在不利环境中生存^[8,9]。因此, 快速检测对食品中副溶血性弧菌的预防和控制至关重要。

细菌免疫学检测方法是利用抗原抗体特异性结合实现检测, 但 VP 表面抗原复杂, 包括外膜蛋白、荚膜多糖、脂多糖, 各类型抗原数量多、结构差异大, 目前仍缺少特异性表面抗原用于制备高质量单克隆抗体。外膜蛋白是常用的免疫检测抗原, 可引起有效的免疫反应^[10,11]。近年来基于表面蛋白组技术, 即胰蛋白酶处理结合质谱分析全部或部分暴露在细胞膜外的所有表面蛋白质, 已成功应用于发掘革兰氏阳性致病菌的疫苗靶点^[12-15]。但革兰氏阴性菌表面蛋白组学研究面临细胞壁肽聚糖含量低、结构疏松, 胞内蛋白容易渗漏的问题^[16,17]。更特殊的是, VP 具有嗜盐性, 需要一定的渗透压来维持细胞形态完整, 在常规方法中该菌更容易渗漏^[18]。

金属有机骨架 (MOF) 是一种由金属离子与有机配体自组装形成的网状晶体多孔纳米材料, 可以有效的用于活细胞的多孔保护外骨骼, 维持细胞在胁迫环境下的形态和生理活性, 具有生物相容性好、化学性质稳定、结构可调控等优点^[19-21]。目前, 多种生物大分子, 包括微生物、蛋白质、DNA、和酶等^[22,23], 均可以在生理条件下通过仿生矿化被 MOF 材料封装从而增强其稳定性, 并应用于环境治理、疫苗、制药和生物储存等各方面^[24-26]。Liang 等^[27]首次证明了 ZIF-8

可以在活酵母细胞和藤黄微球菌的细胞壁上结晶形成一层保护壳, 保护生物体免受外部环境的影响并保持细胞活性, 在 ZIF-8 外壳去除后, 细胞立即恢复了全部功能。Liu 等^[28]使用 ZIF-8 结合柠檬酸对枯草芽孢杆菌进行仿生矿化, 对有机污染物多环芳烃 (PAH) 的去除率达 94.14%, 而且提高降解菌在有毒环境中的存活能力。

用 MOF 材料 ZIF-8 对 VP 进行包裹和可控降解从而形成不同包裹程度的保护壳, 有望在不破坏菌体的前提下, 解决菌体胞内蛋白的渗漏, 从而为进一步分析菌体表面蛋白组, 促进食源性致病菌特异性外膜蛋白的发掘、免疫检测方法及疫苗的开发提供技术支撑。因此, 本研究通过“一锅法”条件优化对 VP 进行了 ZIF-8 的仿生矿化, 并开发了 ZIF-8 快速可控的降解方法和检测方法, 评估了 ZIF-8 包裹后、降解后对 VP 的包裹效果、细菌完整性、存活能力及胞内蛋白渗漏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

副溶血性弧菌 (CICC 21618), 中国工业微生物菌种保藏管理中心; 乙酸锌、二甲基咪唑、胰蛋白酶, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 无水磷酸二氢钾、十二水和磷酸氢二钠、氢氧化钠、氯化钾、无水乙醇、氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 多聚甲醛、碳酸氢铵, 阿拉丁生化科技公司; 溶菌酶, 上海生工生物有限公司, 蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖, 英国 Oxoid 公司; BCA 微量蛋白定量试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 仪器与设备

SCI550-Pro 数显加热型 7 寸方盘磁力搅拌器, 北

京创誉科技有限公司; S-3C 酸度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; DHG-9240A 型电热恒温培养箱, 北京市六一仪器厂; TS-2102C 空气浴摇床, 上海捷呈实验仪器有限公司; CF1524R 高速冷冻型微量离心机, 湖南赫西仪器; Hitachi Regulus8100 扫描电子显微镜 SEM, 日立科学仪器(北京)有限公司; 1300 系列 A2 生物安全柜, 赛默飞世尔仪器有限责任公司; T6 新世纪紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化与培养

副溶血性弧菌从 -80°C 冰箱取出, 用 3 wt.% NaCl LB 固体平板活化传代, 挑单菌落于 3 wt.% NaCl 碱性蛋白胨水中, 37°C 摇床 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温培养 3 h, 培养至 OD_{600} 为 0.6, 备用。

1.3.2 “一锅法”制备 VP@ZIF-8

参考文献中 ZIF-8 的合成方法^[22], 并进行了改良。取新鲜菌液 (10^9 CFU/mL), 用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗涤三次后重悬于 0.4 mL PBS 中, 加 1 mL $160\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲基咪唑溶液静置 10 min, 再加入等体积 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二水合乙酸锌水溶液, 将混合物置于磁力搅拌器上, $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 反应 10 min 在菌体表面形成 ZIF-8 涂层。 $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃上清, 用超纯水洗涤三次, 得到 VP@ZIF-8, 备用。采用同样的方法制备 ZIF-8 纯晶体。

1.3.3 VP@ZIF-8 包裹表征

采用 SEM 和 EDS+Mapping 对包裹效果进行表征。VP 和 VP@ZIF-8 加预冷的 2.5% (V/V) 戊二醛, 4°C 固定过夜, 吸出固定剂, 用 PBS 浸洗 3 次, 再分别用体积分数为 50%、70%、80%、90%、100% (V/V) 的乙醇溶液对样品进行梯度脱水, 每次 15 min, 100% (V/V) 乙醇溶液脱水 2 次。取少量样品滴在盖玻片上干燥后, 用 SBC12 型溅射镀膜机镀金处理, 上机获取 SEM 图像, EDS 数据以及 Mapping 实验结果。

1.3.4 ZIF-8 晶体的可控降解

紫外检测 ZIF-8 降解产物二甲基咪唑的方法建立。用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (值 5.0) 溶液配制质量浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二甲基咪唑标准溶液。分别往 2 mL 离心管中加入 0、0.1、0.5、1、1.5 mL 标准溶液, 再向各管中加入 PBS (值 5.0) 补至 2 mL, 充分混匀。室温静置 5 min 后, 测定 206 nm 处的吸光度值。根据所测数值, 以二甲基咪唑浓度为横坐标, 以 OD_{206} 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。

ZIF-8 降解过程中的释放动力学测定。测定 VP@ZIF-8 制备结束时上清液的 OD_{206} 吸光值, 即可计算未参加包裹反应的二甲基咪唑, 结合反应前二甲基咪唑加入量可得到包裹在菌体上的二甲基咪唑量。然后将 VP@ZIF-8 分别用 $5\text{ mL } 50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 值 7.0) EDTA 和 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 值 5.0) 溶液重悬使 ZIF-8 保护壳降解, 分别监测降解 30 s、3、15、30 min、1、3、24 h 的 OD_{206} 吸光值, 进而计算 ZIF-8 保护壳的释放动力学曲线。

1.3.5 ZIF-8 对菌体的仿生矿化包裹效率及降解后存活率

首先, 对培养至对数期 (OD_{600} 为 0.4) 的副溶血性弧菌菌体进行梯度稀释、平板计数, 得到实验初始菌量 (a), 各组均取相同批次菌液和体积用于实验。将制备的 VP@ZIF-8 进行平板计数, 包裹成功的菌体不会形成菌落, 而未包裹的菌量 (b) 会形成单菌落, 从而可得到仿生矿化的包裹率 $[(a-b)/a\times 100\%]$ 。将 VP@ZIF-8 用 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶菌酶溶液在 37°C 处理 2 h 以去除未包裹的 VP, 通过离心弃上清去除溶菌酶, 将其重悬后涂布在 LB 平板和接种在 LB 液体培养基中培养 12 h, 检验未包裹 VP 是否被去除。随后, 将一份 VP@ZIF-8 样品重悬在无菌 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (值 5.0) 中处理 30 min 去除 ZIF-8 保护壳, 另外一份 VP@ZIF-8 样品重悬在 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 溶液中处理 15 min 去除 ZIF-8 保护壳, 随后 PBS 洗涤三次后进行梯度稀释和平板计数。对照组 (VP) 样品除不经过仿生矿化和溶菌酶处理外, 所有操作过程同实验组。

1.3.6 ZIF-8 对副溶血性弧菌菌体完整性的保护作用

分别采用溶菌酶和纯水处理研究 ZIF-8 对 VP 组、VP@ZIF-8 组、VP@ZIF-8 PBS 降解组、VP@ZIF-8 EDTA 降解组菌体完整性的影响。将 1 mL 测试组菌液 ($\text{OD}_{600}=0.40$) 分别加入到 1.5 mL 离心管中, $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃上清, 用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗涤两次。同时向沉淀物中加入 2 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶菌酶溶液, 用移液枪将沉淀物和溶剂吹吸混匀, 置于 37°C 摇床以 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡 2 h。通过革兰氏染色, 在光学显微镜下观察细胞形态。用纯水代替溶菌酶, 其它操作同上, 测试 ZIF-8 晶体对菌体的保护性。

1.3.7 ZIF-8 对副溶血性弧菌胞内蛋白渗漏的保护作用

采用胰蛋白酶酶切细菌细胞研究胞内蛋白渗漏情况。副溶血性弧菌用 3.0 wt.% NaCl 的 LB 培养基 37°C 培养至 OD_{600} 为 0.40, 达到菌体生长对数期。取 50 mL 菌液于 4°C , $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集菌体, 并用 PBS 洗涤两次后将菌体重悬于 $1\text{ mL } 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

PBS 溶液中, 加入 $500\ \mu\text{L}\ 10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测序级胰蛋白酶工作液, 胰蛋白酶工作液使用 $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液配制。在 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中消化 $20\ \text{min}$, 随后 $4\ ^\circ\text{C}$, $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\ \text{min}$, 取上清过 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤膜得到细菌蛋白样品。VP@ZIF-8 包裹组、VP@ZIF-8 经 PBS 和 EDTA 降解的菌体均采用同一批副溶血性弧菌进行包裹和降解处理, 在用胰蛋白酶处理前使用溶菌酶将未包裹的 VP 清除, 随后以同样的操作获取表面蛋白样品。加胰蛋白酶消化处理的 VP、VP@ZIF-8、VP@ZIF-8 经 PBS 和 EDTA 组的对照组分别加入等量不含胰蛋白酶的 $25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵缓冲溶液 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴处理 $20\ \text{min}$, 其它操作相同。蛋白含量的测定按照 BCA 蛋白定量测定试剂盒的说明书进行。

1.3.8 数据分析

所有实验均进行了至少三次独立重复, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 并使用 SPSS 进行统计分析, 图表绘制则通过 Origin 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 VP@ZIF-8 的制备与表征

本研究通过优化反应体系, 实现了 ZIF-8 纳米晶体在副溶血性弧菌细胞表面快速成核, 从而形成了仿生矿化壳。副溶血性弧菌与二甲基咪唑和二水合乙酸锌水溶液混合后, 溶液颜色在几秒钟内由无色变为浑浊乳白色, 反应结束后的菌体沉淀由包裹前的棕红色变为乳白色, 体积明显变大 (图 1)。SEM 图像显示 ZIF-8 晶体附着在菌体身上, 包裹后的菌体表面变得粗糙, 有晶体感, 体积增大, 而未包裹的细菌表面顺滑 (图 2)。ZIF-8 包裹的菌体表面不是均一的十二面体菱面体晶体, 这是因为包裹后用蒸馏水反复洗涤以去除未反应前体, 而纯水体系中合成的 VP@ZIF-8 复合物大部分会转化为无定型^[29]。EDS 和元素映射 mapping 结果显示 (图 3、图 4), Zn 在副溶血性弧菌表面未有检出, 而 VP@ZIF-8 表面的 Zn 元素占比达到 31.00%, 且元素分布与菌体形态保持一致, 也与菌体表面 C、N 元素的分布一致, 说明 Zn 元素均匀附着在菌体表面。上述证据表明 ZIF-8 成功合成并包裹在菌体表面, 形成了保护壳。Liang 等^[22]首次证明了 ZIF-8 可以在活酵母细胞和藤黄微球菌的细胞壁上结晶形成一层均匀完整的保护壳, 保护生物体免受外部环境的影响并保持细胞活性, 在 ZIF-8 外壳去除后, 细胞立即恢复了全部功能。Liu 等^[28]使用 ZIF-8 结合柠檬酸对枯草芽孢杆菌进行仿生矿化, 同样可以实现

均匀完整的包裹。

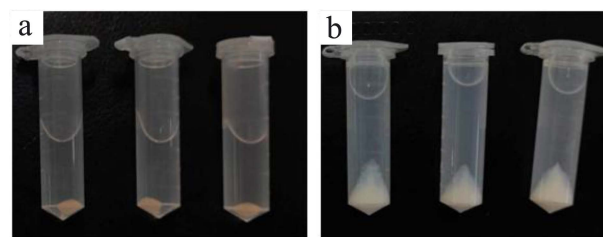


图 1 副溶血性弧菌包裹 ZIF-8 前后的菌体沉淀

Fig.1 Cell precipitation before and after encapsulation of ZIF-8 by *V. parahaemolyticus*

注: a 为 VP; b 为 VP@ZIF-8。

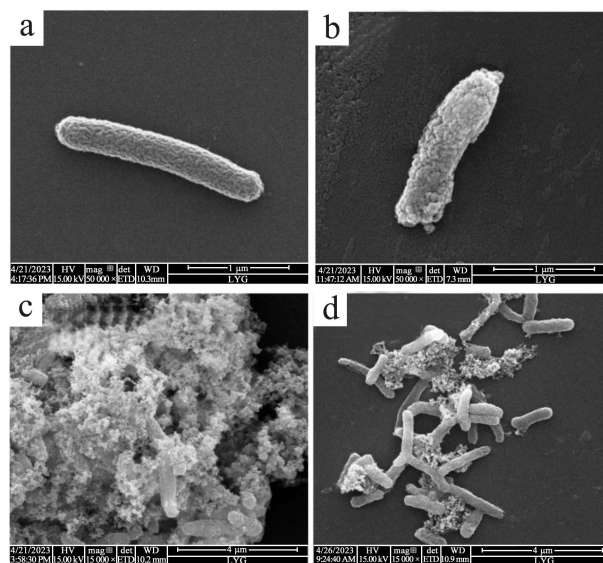


图 2 副溶血性弧菌包裹 ZIF-8 前后的 SEM 图

Fig.2 SEM image of *V. parahaemolyticus* before and after wrapping ZIF-8

注: a: 未经包裹的 VP 对照组, 标尺 $1\ \mu\text{m}$; b: $1\ \text{mL}$ 二甲基咪唑溶液 + $1\ \text{mL}$ 二水合乙酸锌水溶液反应得到的 VP@ZIF-8, 标尺 $1\ \mu\text{m}$; c: $5\ \text{mL}$ 二甲基咪唑溶液 + $5\ \text{mL}$ 二水合乙酸锌水溶液反应得到的 VP@ZIF-8, 标尺 $4\ \mu\text{m}$; d: $1\ \text{mL}$ 二甲基咪唑溶液 + $1\ \text{mL}$ 二水合乙酸锌水溶液反应得到的 VP@ZIF-8, 标尺 $4\ \mu\text{m}$ 。

在 ZIF-8 对副溶血性弧菌的包裹中, 蛋白质在配体和金属离子的成核反应中发挥重要作用, 而菌体细胞的外膜蛋白, 使 ZIF-8 对菌体的包裹成为可能。二甲基咪唑充分去质子化与 Zn^{2+} 反应在菌体表面形成 ZIF-8 晶核, 中性二甲基咪唑吸附于带正电的 ZIF-8 纳米晶体后终止增长, 并在菌体表面仿生矿化形成保护壳^[23]。过去十年, ZIF-8 的合成参数研究已取得很大进步, 本研究发现 ZIF-8 包裹菌体的完整性、均一性以及分散性受菌液用量、前体反应溶液的摩尔比、前体反应溶液的用量、前后顺序、反应时间等因素的影响。咪唑与乙酸锌的摩尔比越大合成的 ZIF-8 粒径越小, 在参考前人研究的基础上, 本研究采用二甲基咪唑:

乙酸锌=4:1 的摩尔比条件, 对前体反应溶液的用量进行了优化, 前体反应溶液用量越大溶液中游离的纳米晶体越多, 大量的菌体因为游离的 ZIF-8 晶体聚集在一起, 导致包裹后的菌体分散性很差。因此, Tang 等^[30]开发了一种基于微流控技术的细菌表面仿生矿化方法, 使大肠杆菌的表面形成了一层均匀一致的 ZIF-8 外壳。此外, 反应溶液添加的先后顺序对结果影响很大, 若先添加乙酸锌溶液与菌体混匀, 会导致局部锌离子浓度偏高, 形成更紧密的包裹, 导致包裹的不均匀性; 后添加乙酸锌溶液, 咪唑离子会首先与细菌表面某些官能团形成配位作用, 锌离子在二甲基咪唑的存在下更容易被吸附形成 ZIF-8 晶体, 包裹完整性更好并且能改善晶体质量。

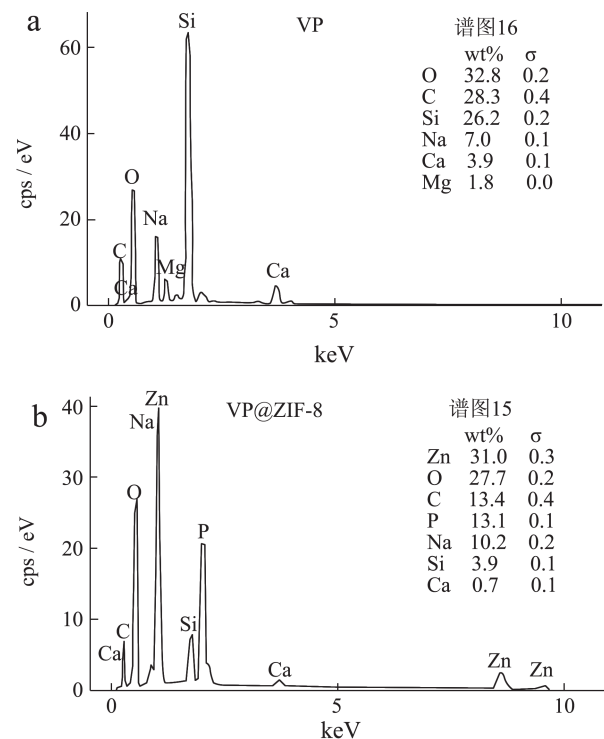


图3 副溶血性弧菌包裹 ZIF-8 前后的 EDS 图谱

Fig.3 EDS profile of *V. parahaemolyticus* before and after encapsulation of ZIF-8

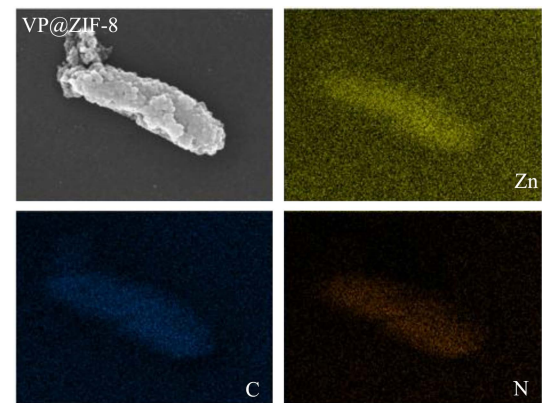
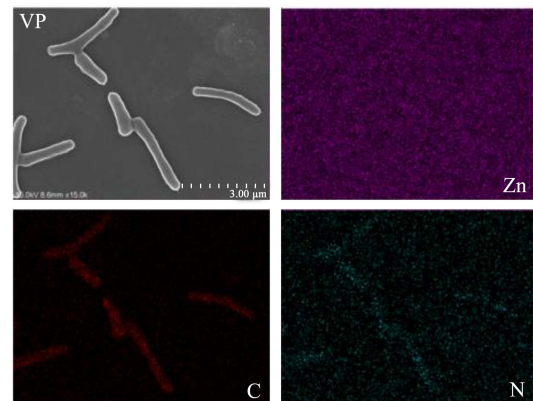


图4 副溶血性弧菌包裹 ZIF-8 前后的元素映射 mapping

Fig.4 Elemental mapping of *V. parahaemolyticus* before and after encapsulation of ZIF-8

2.2 VP@ZIF-8晶体的可控降解方法研究

ZIF-8 包裹的厚度会同时影响细菌胞内蛋白的渗漏以及表面蛋白的暴露, 若 ZIF-8 的厚度过高, 外膜蛋白暴露不完全, 胰蛋白酶无法接触外膜蛋白, 而 ZIF-8 完全降解释放, 则可能会出现胞内蛋白的渗漏, 因此可控的降解菌体表面的 ZIF-8 是实验关注的重点。为此, 在 ZIF-8 降解过程的检测方法开发中, 本研究尝试了 Zn^{2+} 浓度定量法检测和二甲基咪唑浓度紫外法检测两种方法, 但实验结果发现 ZIF-8 降解过程与 Zn^{2+} 浓度无明显规律, 这主要是因为 ZIF-8 晶体降解时会释放 Zn^{2+} 和二甲基咪唑有机配体, 而 Zn^{2+} 会和 PBS 中的磷酸根离子反应生成不溶物磷酸锌^[21]。如图 5 所示, 标准曲线为 $Y=0.064\ 7X+0.320\ 7, R^2=0.999\ 1$ 。

在不同缓冲液中 ZIF-8 保护壳降解后的二甲基咪唑释放动力学曲线如图 6 所示, 在 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 溶液 (pH 值 7.0) 中 1 min 内降解率达到 71.60%, 5 min 达到 90.20%, 最终降解率稳定在 96.00%, 与前人的研究相似, 把酵母细胞的 ZIF-8 保护壳加入 EDTA 后, ZIF-8 迅速降解, 细胞恢复生长^[22]。在 PBS (pH 值 5.0) 溶液中 15 min 内降解率达 80.83%, 之后趋于稳定, 在 PBS (pH 值 7.2) 溶液中, 3 min 内降解率到 16.59%, 之后趋于稳定。高浓度 EDTA 也会整合细胞表面膜蛋白的二价金属离子, 可能导致细胞膜结构的破坏, 并且 EDTA 的降解速度非常快, 无法控制。已经有文献报道 ZIF-8 在酸性环境下不稳定, 酸性的 PBS 可以给细胞提供相对稳定的生存条件, 维持细菌细胞完整性^[23]。因此, 本实验比较了 EDTA 法以及酸性 PBS 法的降解效果。通过检测发现, 副溶血性弧菌菌体包裹的 ZIF-8 不能被 pH 值 5.0 的 PBS 完全降解, 即使使用 pH 值 5.0 的 PBS 进行二次降解也没有更多的二甲基咪唑释放出来, 菌体也没有恢复到未包裹

时的颜色。这一结果与文献报道一致，原因是 Zn^{2+} 与细胞表面磷酸基之间通过金属配位相互作用形成了 $\text{Zn-O-P}^{[29]}$ 。

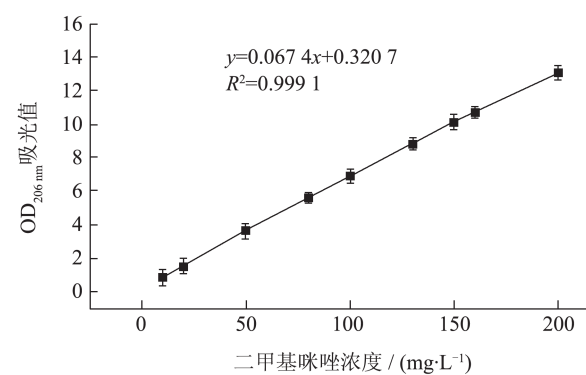


图5 二甲基咪唑在 PBS (pH 值 5.0) 中的标准曲线
Fig.5 Standard curve of dimethylimidazole in PBS (5.0)

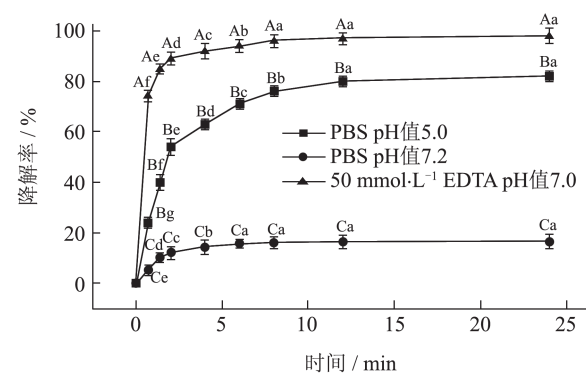


图6 VP@ZIF-8 在 3 种降解缓冲液中的二甲基咪唑
释放动力学曲线
Fig.6 Kinetic curve of dimethylimidazole release from
VP@ZIF-8 in three release buffers

注：图中不同的大写字母代表组间具有显著差异 ($P<0.05$)，小写字母表示组内具有显著差异 ($P<0.05$)，下同。

2.3 ZIF-8对副溶血性弧菌菌体完整性的保护作用

分别用溶菌酶和纯水处理 VP 组、VP@ZIF-8 组、VP@ZIF-8 PBS 降解组和 VP@ZIF-8 EDTA 降解组。经革兰氏染色显微镜观察发现 (图 7)，VP 处理后细胞结构破碎，而 VP@ZIF-8 和 VP@ZIF-8 PBS 降解组、VP@ZIF-8 EDTA 降解组仍然保持完整的细胞形态。用纯水代替溶菌酶处理，也得到了相同的结果，说明 ZIF-8 涂层以及 PBS 和 EDTA 降解后残留的 ZIF-8 可以有效的保护细菌结构免受溶菌酶和低渗透压的破坏。ZIF-8 在以往文献报道中已发现可以对酿酒酵母、病毒、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等细胞实现保护作用，而本研究发现通过为 5.0 的 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 和 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 处理无法完全降解副溶血性弧菌菌

体外的 ZIF-8 保护壳，剩余 19.27% 和 4.00% 的 ZIF-8 材料仍然提供了对副溶血性弧菌菌体良好的保护作用，避免了溶菌酶和低渗透压下菌体的破裂。ZIF-8 的包裹程度同时影响胞内蛋白的渗漏以及外膜蛋白的暴露。因此，通过降解获得不同包裹程度的 ZIF-8 并研究其对细菌的保护作用，有助于获得既能避免胞内蛋白渗漏，同时可以实现外膜蛋白暴露的实验条件，以便于后续的表面蛋白组分析。

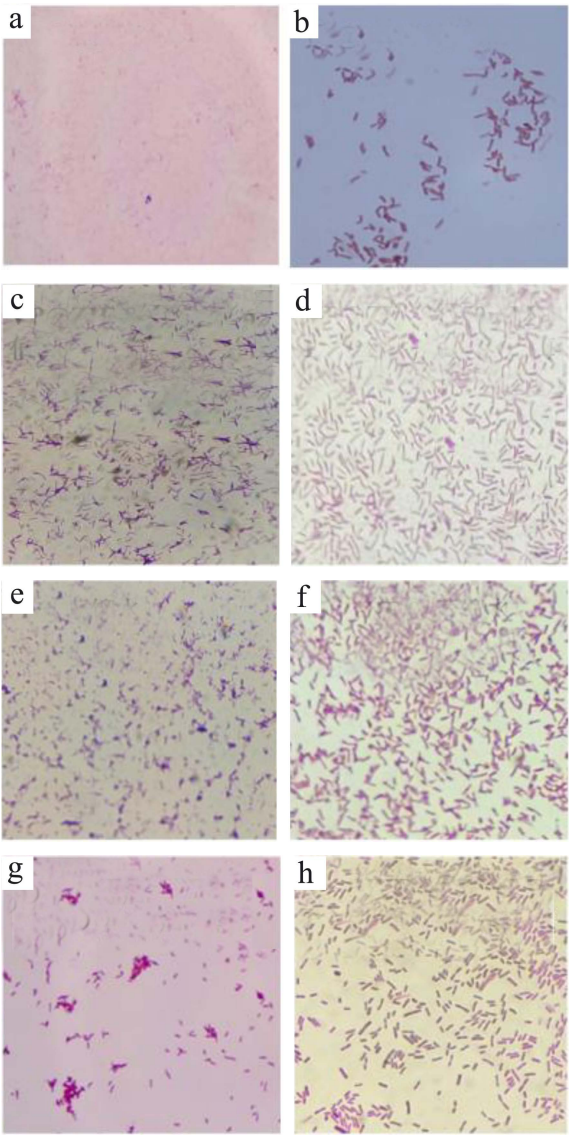


图7 溶菌酶和纯水处理 ZIF-8 包裹后、降解后副溶血性弧菌
的光学显微镜图像
Fig.7 Light microscope image of *V. parahaemolyticus* after
mineralization and degradation

注：a 为 VP+ 溶菌酶；b 为 VP@ZIF-8+ 溶菌酶；c 为 VP@ZIF-8 经 PBS (pH 值 5.0) 降解后 + 溶菌酶；d 为 VP@ZIF-8 经 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 降解后 + 溶菌酶；e 为 VP+ 蒸馏水；f 为 VP@ZIF-8+ 蒸馏水；g 为 VP@ZIF-8 经 PBS (pH 值 5.0) 降解后 + 蒸馏水；h 为 VP@ZIF-8 经 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 降解后 + 蒸馏水。

2.4 ZIF-8保护壳降解前后副溶血性弧菌的自我再生能力评估及胞内蛋白渗漏情况

通过平板计数得到 VP 菌液浓度 a 为 1.37×10^9 CFU/mL, VP@ZIF-8 样品中未被包裹的 VP 活菌浓度 b 为 30×10^3 CFU/mL, 而包裹成功的菌体不会进行自我繁殖, 由此 ZIF-8 封装菌体的包裹率根据公式 $[(a-b)/a \times 100\%]$ 计算为 99.99% (图 8)。VP@ZIF-8 样品经溶菌酶处理后, 平板均未有单菌落长出, 接种到液体 LB 培养基中 37°C 培养 24 h 也未变浑浊, 说明溶菌酶能杀死未被 ZIF-8 包裹的和包裹不完全的 VP。溶菌酶处理后的 VP@ZIF-8 样品进一步经酸性 PBS 降解后, 存活的 VP 菌液浓度为 2.50×10^7 CFU/mL, 经 EDTA 降解后存活的 VP 菌液浓度为 7.94×10^7 CFU/mL, 对照组最终可培养的菌液浓度为 5.00×10^8 CFU/mL。因此, VP@ZIF-8 经过为 5.0 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 降解后的相对存活率为 5.10%, 经过 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 降解后的相对存活率为 17.62%。

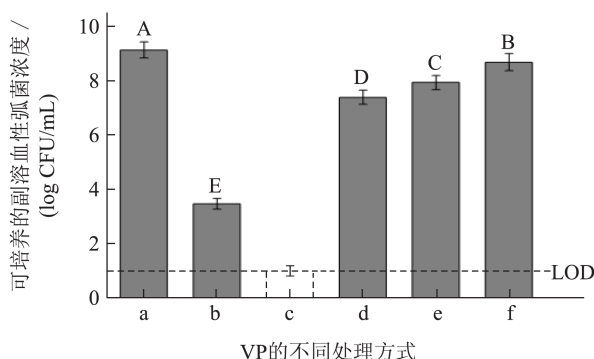


图 8 副溶血性弧菌在 ZIF-8 包裹后、降解后的存活情况

Fig.8 Survival of *V. parahaemolyticus* after mineralization and degradation

注: a 为 VP, b 为 VP@ZIF-8, c 为在 b 组的基础上用溶菌酶处理, d 为在 c 组的基础上用 PBS (pH 值 5.0) 处理, e 为在 c 组的基础上用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 处理, f 为对照组。

胰蛋白酶对多肽链中赖氨酸和精氨酸残基的羧基具有特异性水解作用, 可以用于表面蛋白质组学研究中的酶解实验。如图 9 所示, 单纯的菌体在经胰蛋白酶处理和未经酶切处理, 蛋白质量浓度分别为 $3652.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2894.53 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明酶切后得到蛋白浓度增加, 但胞内蛋白渗漏严重; 经过 ZIF-8 包裹后的菌体未经酶切的对照样品蛋白浓度仅为 $65.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 经胰蛋白酶处理后, 释放的蛋白质量浓度为 $256.38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 采用为 pH 值为 5.0 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 降解 30 min 的 VP@ZIF-8 样品, 未经胰蛋白酶酶切处理得到的蛋白质量浓度为 $140.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胞内蛋白渗漏减少了 95.16%, 而经胰蛋白酶处理后得

到的蛋白质量浓度为 $589.26 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 采用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 降解的 VP@ZIF-8 样品, 未经胰蛋白酶酶切处理得到的蛋白质量浓度为 $135.47 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胞内蛋白渗漏减少了 94.47%, 而经胰蛋白酶处理后得到的蛋白质量浓度为 $812.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。说明与未包裹 ZIF-8 的 VP 样品相比, 包裹 ZIF-8 后以及 ZIF-8 不完全降解后, 均可以有效保护副溶血性弧菌形态完整, 显著降低胞内蛋白渗漏水平, 并且随着 ZIF-8 降解程度的增加, ZIF-8 外壳厚度降低, 外膜蛋白的暴露程度增加, 有更多的外膜蛋白被酶切, 这将有利于表面蛋白的组学分析。

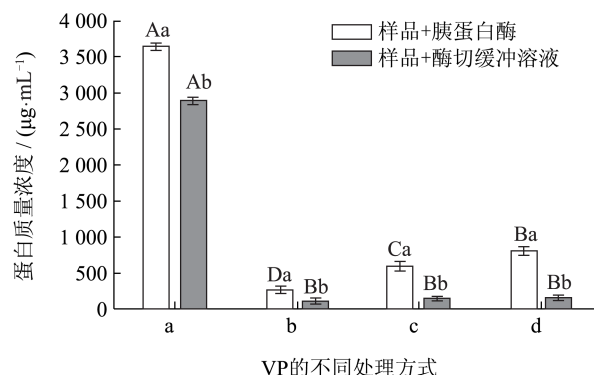


图 9 副溶血性弧菌在包裹后、降解 ZIF-8 后经胰蛋白酶处理后测定

Fig.9 Determination of surface protein component content

注: a 为 VP, b 为 VP@ZIF-8, c 为 VP@ZIF-8 经 PBS (pH 值 5.0) 降解, d 为 VP@ZIF-8 经 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 降解。

3 结论

本研究通过“一锅法”合成条件的优化, 成功在副溶血性弧菌表面包裹了 ZIF-8 纳米晶体保护壳, 包裹率为 99.99%。通过二甲苯咪唑紫外法检测发现, 经过酸性 PBS (5.0) 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 处理可实现 15 min 后 ZIF-8 的降解率为 80.83% 和 96.00%, 可保护菌体在溶菌酶的低渗透压下的完整性, 降解后细菌存活率分别为 5.10% 和 17.62%, 胞内蛋白渗漏分别减少了 95.16% 和 94.47%, 胰蛋白酶处理后得到的蛋白浓度增加, 能够满足组学分析需要, 为进一步研究不同 ZIF-8 厚度下, 副溶血性弧菌表面蛋白组的差异奠定了基础。ZIF-8 在细菌表面的仿生矿化和降解技术为在免疫检测和疫苗开发领域中, 进行副溶血性弧菌以及其它革兰氏阴性菌表面蛋白组学分析和表面抗原发掘提供了新的思路。

参考文献

- [1] 余权. 水产品中副溶血性弧菌致病性和检测方法研究进展[J]. 中国食品工业, 2023, 2: 55-58.

- [2] 黄志深,许喜林,张明明,等.市售水产品中副溶血性弧菌的毒力及药敏性分析[J].现代食品科技,2021,37(8):308-316.
- [3] LI M Z, XU H Y, TIAN Y Q, et al. Comparative genomic analysis reveals the potential transmission of *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater food to humans [J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104277.
- [4] 李荣,陈家良,王洋,等.副溶血性弧菌引起食源性疾病暴发事件调查与病原特征分析[J].山西医科大学学报,2024,55(1):99-103.
- [5] CABURLOTTO G, SUFFREDINII E, TOSON M, et al. Occurrence and molecular characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* in crustaceans commolercialised in Venice area, Italy [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 220: 39-49.
- [6] LI Y, XIE T F, PANG R, et al. Food-borne *Vibrio parahaemolyticus* in China: prevalence, antibiotic susceptibility, and genetic characterization [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1670.
- [7] 周倩,向婧姝,黄靖宇,等.贵阳市淡水产品及养殖环境致病性弧菌监测结果分析[J].应用预防医学,2022,28(4):352-354,396.
- [8] FANG G Y, LIU X Q, MU X J, et al. Distinct increase in antimicrobial resistance genes among *Vibrio parahaemolyticus* in recent decades worldwide [J]. Chemosere, 2023, 340: 139905.
- [9] 操青青,赵力超,方祥,等.基于时间分辨纳米荧光微球的免疫层析技术快速检测副溶血性弧菌[J].现代食品科技,2023, 39(1): 326-334.
- [10] 刘建欣,刘蕾,郭珊珊,等.副溶血性弧菌外膜蛋白BamA重组表达及其免疫原性分析[J].江苏农业科学,2022,50(15):43-50.
- [11] 高云山,刘丹丹,徐俊林,等.嗜水气单胞菌孔蛋白OmpF重组表达及其免疫原性分析[J].生物技术通报,2019,35(9):234-243.
- [12] PRADOS DE LA TORR E, RODRIGUEZ-FRANCO A, RODRIGUEZ-ORTEGA M J. Proteomic and bioinformatic analysis of streptococcus suis human isolates: Combined prediction of potential vaccine candidates [J]. Vaccines, 2020, 8(2): 188.
- [13] OLAYA-ABRIL A, JIMENEZ-MUNGUIA I, GOMEZ-GASCON L, et al. Surfomics: shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins [J]. Journal of Proteomics, 2014, 97: 164-176.
- [14] BAUSCH-FLUCK D, HOFMANN A, BOCK T, et al. A mass spectrometric-derived cell surface protein atlas [J]. Plos One, 2015, 10(4): 0121314.
- [15] ELSCHENBROICH S, KIM Y, MEDIN J A, et al. Isolation of cell surface proteins for mass spectrometry-based proteomics [J]. Expert Review of Proteomics, 2010, 7(1): 141-154.
- [16] LI Y, QIN H, YE M. An overview on enrichment methods for cell surface proteome profiling [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(1): 292-312.
- [17] HORNBURG D, KRUSE T, ANDERL F, et al. A mass spectrometry guided approach for the identification of novel vaccine candidates in gram-negative pathogens [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 17401.
- [18] WANG W W, LIU J X, GUO S S, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. specific outer membrane proteins by reverse vaccinology and surface proteome [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 625315.
- [19] 蔡嘉斌.金属有机框架仿生矿化体系提高蛋白质稳定性的研究[D].杭州:浙江大学,2022.
- [20] SUN H, LI Y, YU S, et al. Metal-organic frameworks (MOFs) for biopreservation: From biomacromolecules, living organisms to biological devices [J]. Nano Today, 2020, 35: 100985.
- [21] RODRIGUES J, PEREIRA S, J, ZANONI J, et al. The impact of ysiological buffer solutions on zinc oxide nanostructures: Zinc osate conversion [J]. Materials Today Chemistry, 2022, 23: 100629.
- [22] LIANG K, RICCO R, DOHERTY C M, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules [J]. Nature Commolunications, 2015, 6(1): 7240.
- [23] SINGH R, WHITE J F, DE VRIES M, et al. Biomimetic metal-organic frameworks as protective scaffolds for live-virus encapsulation and vaccine stabilization [J]. Acta Biomaterialia, 2022, 142: 320-331.
- [24] 付潇.沸石咪唑酯骨架材料的可控制备及其在药物和疫苗递送中的研究[D].济南:山东大学,2020.
- [25] CHEN G, HUANG S, KOU X, et al. A convenient and versatile amino-acid-boosted biomimetic strategy for the nondestructive encapsulation of biomacromolecules within metal-organic frameworks [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(5): 1463-1467.
- [26] LUZURIAGA M A, HERBERT F C, BROHIIN O R, et al. Metal-organic framework encapsulated whole-cell vaccines enhance humoral immolunity against bacterial infection [J]. ACS Nano, 2021, 15(11): 17426-17438.
- [27] LIANG K, RICHARDSONi J J, CUI J, et al. Metal-organic framework coatings as cytoprotective exoskeletons for living cells [J]. Advanced Materials, 2016, 28(36): 7910-7914.
- [28] LIU M, ZHANG L, YANG R, et al. Integrating metal-organic framework ZIF-8 with green modifier empowered bacteria with improved bioremediation [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 461: 132475.
- [29] WEI H, YANG X Y, GENG W, et al. Interfacial interactions between protective, surface-engineered shells and encapsulated bacteria with different cell surface composition [J]. Nanoscale, 2021, 13(15): 7220-7233.
- [30] TANG R B, SHEN L H, YANG L, et al. Killing two birds with one stone: biomineralized bacteria tolerate adverse environments and absorb hexavalent chromium [J]. ACS Omega, 2022, 7(18): 15385-15395.