

文章编号: 1000-0615(2017)11-1779-09

DOI: 10.11964/jfc.20160810516

副溶血弧菌与肝素结合相关黏附蛋白的鉴定

杨娅楠¹, 王婧婷¹, 陈萌¹, 耿绪云², 袁增智^{1*}, 孙金生^{1*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387;

2. 天津市水生动物疫病预防控制中心, 天津 300221)

摘要: 黏附因子在病原菌的致病过程中发挥了重要作用, 鉴定新的黏附因子是了解病原菌致病机制的重要手段。本研究中首次发现游离肝素能够竞争性抑制副溶血弧菌与Hela细胞的黏附, 表明细胞外基质中的肝素可能是细菌重要的细胞表面黏附受体。进一步利用肝素亲和层析技术垂钓到6种副溶血弧菌的外膜蛋白, 并通过基因克隆和原核表达技术成功获得重组的外膜蛋白并对其进行了深入研究。重组蛋白IMPDH、EF-Tu和OppA可黏附Hela细胞, 并可以显著抑制副溶血弧菌与Hela细胞的黏附, 说明这3种蛋白可能是其重要的潜在黏附因子。

关键词: 副溶血弧菌; 肝素; 外膜蛋白; 黏附因子

中图分类号: Q 938.8; S 917.1

文献标志码: A

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是广泛分布于沿岸海水、河海交界以及鱼、虾、贝类等海产品中的一种常见的革兰氏阴性嗜盐性短杆菌, 可引起腹泻、呕吐和发烧等典型的胃肠炎及食物中毒, 是我国沿海地区细菌性食物中毒的主要致病菌^[1-2]。

黏附作用是病原菌感染宿主的首要条件, 其实质是病原菌表面的特殊结构及蛋白与宿主靶细胞表面受体黏附并相互作用, 进而发生定居、繁殖、聚集毒力因子等阶段, 最终使机体患病^[3]。弧菌的黏附素主要包括由菌毛、纤毛等组成的菌毛黏附素和由外膜蛋白(OMPs)、脂多糖、胞外多糖等构成非菌毛黏附素两类^[4]。有关VP黏附素的研究较少, 已证实的黏附因子包括VP菌毛、纤毛等结构^[5-6]。另外, 最近研究表明VP的外膜蛋白VpadF可与宿主细胞的纤连蛋白和纤维蛋白原结合介导黏附过程^[7]。发掘更多的VP黏附因子, 深入研究其与宿主细胞相互作用的分子基础对于阐明VP的分子致病机制非常重要, 可为研制抗细菌感染的新药提供理论

基础。

肝素是细胞外基质中糖胺聚糖的一种, 由糖醛酸和葡萄糖胺组成的重复二糖单位聚合成的多糖链的混合物^[8]。肝素是细胞外基质中蛋白聚糖的重要组成成分之一, 位于细胞的最外侧, 是许多病原微生物的理想黏附受体。体外研究表明, 葡萄球菌属(*Staphylococci* sp.)和部分链球菌属(*Streptococci* sp.)病原菌与真核细胞的黏附由糖胺聚糖所介导^[9-11], 百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)等病原菌与糖胺聚糖中的硫酸乙酰肝素作用完成黏附^[12-13], 而肝素前体和外源性肝素都能明显的抑制病原菌与肠道的黏附^[14]。那么VP在致病过程中是否也存在类似机制? 据此, 本研究通过体外黏附实验探究外源肝素对VP黏附Hela细胞的影响, 通过肝素亲和层析及质谱筛选鉴定与肝素结合的VP外膜蛋白, 并评价其对病原菌黏附宿主细胞的过程的贡献, 为全面探究VP与宿主细胞黏附机制提供参考。

收稿日期: 2016-08-27 修回日期: 2016-12-18

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2012CB114405); 国家自然科学基金(31402322); 天津市应用基础计划项目(15JJCQNJC46400); 天津师范大学博士基金(52XB1412)

通信作者: 袁增智, E-mail: skyzz@mail.tjnu.edu.cn; 孙金生, E-mail: skysjs@mail.tjnu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

VP NY-172株由天津市水生动物疫病预防控制中心从患病凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)体内分离、鉴定和保存;Hela细胞株、大肠杆菌DH5 α 株为本实验室保种;Peasy-Blunt E1/E2 Expression vector、大肠杆菌BL21(DE3)菌株购自北京全式金生物技术有限公司;肝素、肝素亲和层析柱、LB培养基、TCBS培养基等购于生工生物工程(上海)股份有限公司;DMEM培养液、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、胰酶等购自Thermo Fisher Scientific;多聚组氨酸标签单抗、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗购于天津三箭生物技术有限公司。

1.2 体外黏附实验

实验方法参考Liu等^[7]的报道:将过夜培养的VP NY-172株接种于含3%(v/v)NaCl的LB液体培养基中,振荡培养4 h后,离心收集菌体,用无菌的PBS缓冲液离心洗涤3次,用DMEM稀释菌浓度至 1×10^8 CFU/mL;对24孔板里单层的Hela细胞进行计数;分为A、B两组,A组按照细胞:细菌为1:100的比例把NY-172分别稀释到含0、200、500 μ g/mL肝素的DMEM中,30 $^{\circ}$ C孵育30 min,每个细胞孔中加入500 μ L处理后的细菌稀释液,分别设置3个复孔,30 $^{\circ}$ C孵育1 h;B组在24孔细胞板中分别加入100 μ g的各重组蛋白和牛血清白蛋白(BSA)未加蛋白孔(DMEM)为空白对照,分别设置三个复孔,置于30 $^{\circ}$ C温箱中孵育30 min后加入NY-172菌株稀释液,30 $^{\circ}$ C孵育1 h;吸去上清液,PBS洗3次,每孔加入500 μ L裂解液,37 $^{\circ}$ C裂解10 min。取裂解液进行梯度稀释,选取适当的稀释倍数涂布3个平板,过夜培养并菌落计数。计算每组的细菌黏附率(细菌黏附率=菌落平均数 \times 稀释倍数/加入细胞孔总菌数 \times 100%),并按照单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行统计学分析。

1.3 肝素结合蛋白筛选

参照已报道的PMSF法^[15-16]提取VP NY-172的外膜蛋白,采用亲和层析的方法筛选、分离VP与黏附宿主肝素结合蛋白并对其进行蛋白质

谱鉴定。PBS缓冲液平衡肝素亲和层析柱,并将制备好的NY-172外膜蛋白连续上样;以5倍柱体积的PBS缓冲液洗去非结合蛋白后,用洗脱液(NaCl浓度为0.5 mol/L的磷酸盐缓冲液)洗脱和收集目的蛋白,并用SDS-PAGE和质谱方法鉴定目的蛋白。质谱鉴定服务由上海中科新生命生物科技有限公司提供。

1.4 基因克隆、重组表达与纯化

根据质谱鉴定结果,从NCBI中获取VP的IMPDH、OABC、OppA、EF-Tu、IMPDH、TolC等基因的基因序列,经SignalP 4.1及THMHH在线网站预测基因的信号肽和跨膜区后,去掉相应的信号肽或跨膜区及终止密码子,设计上下游引物(表1)。本研究中选用最近报道的VP黏附因子—VpadF作为后续黏附因子鉴定时的阳性对照。

以VP NY-172株基因组为模板,利用PCR扩增技术使用上述引物分别扩增出IMPDH、OABC、OppA、EF-Tu、TolC、VpadF等基因的编码序列,将纯化后的目的片段与Peasy-Blunt E1/E2表达载体进行平末端连接,得到pEASyE2-IMPDH、pEASyE1-OABC、pEASyE2-OppA、pEASyE1-EF-Tu、pEASyE2-TolC、pEASyE2-VpadF等重组质粒,经菌落PCR及双酶切验证正确后,送样测序。

将测序验证正确的原核表达载体分别转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,参照杜欣军等^[17]的方法对各重组蛋白的表达条件进行优化,经SDS-PAGE检测分析各重组蛋白的最佳诱导条件后,进行大规模诱导表达以及镍柱亲和层析纯化,对于以包涵体形式表达的蛋白进一步采用尿素梯度复性的方法复性。利用透析原理将纯化后的蛋白缓冲液置换为PBS缓冲液,以便开展下游实验。

1.5 Western Blot验证重组蛋白

取4 μ g纯化的各重组蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后利用电转仪将蛋白转印至PVDF膜。转膜结束后,PVDF膜使用TBST缓冲液洗涤3次,每次5 min,随后转入封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液)中,4 $^{\circ}$ C封闭过夜。过夜后用TBST缓冲液洗膜3次,每次5 min,加入稀释好的多聚组氨酸标签单抗(1:1000稀释),室温孵育1 h。一抗孵育完成后,使用TBST缓冲液洗膜3次,加入稀释好的HRP-标记羊抗鼠二抗

表 1 引物序列

Tab. 1 The sequences of PCR primers

引物名称 primer	引物序列(5'~3') primer sequence (5'-3')	产物片段长度/bp fragment length
OppAF	CGCGGATCCGCATCTGTCGTTGCAGA	1 560
OppAR	CCGCTCGAGCTTTTAAATGTAGAGTTCT	
EF-TuF	CGCGGATCCATGTCTAAAGAAAAAT	1 182
EF-TuR	CCGCTCGAGTTCTGAAGATCTTAGCA	
IMPDHF	CGCGGATCCTTGCAAATGCTAAGAATT	1 470
IMPDHR	CCGCTCGAGGTTACCTAGACGGTAGTTT	
TolCF	CGCGGATCCGATTCTTTAGCTGAAATCT	1 290
TolCR	CCGCTCGAGTTTCGCTGGTTTCAA	
OABCF	CGCGGATCCATGCTAACGAAAAAACT	1 701
OABCR	CCGCTCGAGCTCAGTGATGTAGAGATC	
VpadF	GACAGTGAAGCAGCACTA	2 124
VpadR	CTTAAGAGGAACGCCAGG	

(1 : 5000 稀释), 室温孵育 1 h。二抗孵育完成后, 使用 TBST 缓冲液洗膜 5 次, 每次 10 min, 于暗处加入新鲜配制的 HRP-DAB 底物显色试剂, 反应 20 min。显色完成后, 使用去离子水冲洗 PVDF 膜, 终止反应, 晾干扫描。

1.6 间接免疫荧光分析

12 孔细胞板中培养至单层的 HeLa 细胞用 PBS 缓冲液洗 3 次后, 加入 -20 °C 预冷的丙酮试剂固定 10 min; 固定后的细胞分别与 100 μg 的重组蛋白或者牛血清蛋白(BSA)一起于 37 °C 条件下孵育 1 h, 未加入蛋白的孔作为空白对照; PBS 缓冲液清洗 3 次, 向各孔中加入 1 mL 按 1 : 200 比例稀释后的多聚组氨酸标签单抗, 37 °C 孵育 30 min; PBS 缓冲液清洗 3 次, 将异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠二抗按 1 : 100 稀释后加入孔中, 37 °C 避光孵育 30 min; PBS 缓冲液避光清洗 5 遍后, 使用荧光显微镜观察细胞表面荧光, 拍照保存。

2 结果

2.1 外源肝素对 VP 黏附宿主细胞的抑制

细胞黏附实验结果表明, VP 与 HeLa 细胞具有较高的黏附作用(图 1), 黏附率达 51%, 而 200 μg/mL 肝素孵育后的 VP 的黏附率降至 37%; 肝素浓度提高至 500 μg/mL 后, 黏附率进一步下

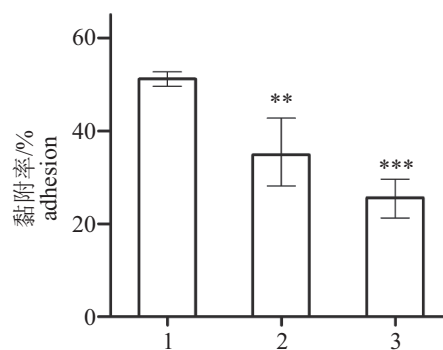


图 1 肝素对 NY-172 黏附 HeLa 细胞的抑制

1. 肝素浓度为 0 μg/mL, 2. 肝素浓度为 200 μg/mL, 3. 肝素浓度为 500 μg/mL, **表示 $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Heparin inhibits the adhesion of NY-172 to HeLa cells

1. 0 μg/mL heparin, 2. 200 μg/mL heparin, 3. 500 μg/mL heparin, ***means $P < 0.01$, the same below

降为 28%。这一结果表明, 肝素处理后的 VP 黏附能力受到一定的抑制, 且随着肝素浓度升高, 抑制效果逐渐增强, 呈现出明显的剂量依赖性。外源性肝素竞争性地抑制了 VP 与 HeLa 细胞外基质中的肝素的结合, 提示肝素是 VP 重要的细胞黏附受体之一。

2.2 VP 与肝素结合外膜蛋白的筛选

提取 VP 的外膜蛋白后, 利用肝素亲和层析的方法, 5 个与肝素结合相关的 VP 外膜蛋白被筛

选并鉴定出来(图2)。生物信息学分析表明,上述5种蛋白均为胞外蛋白,且OppA、OABC蛋白同为底物转运结合蛋白(表2)。

2.3 重组蛋白的基因克隆、蛋白纯化及Western Blot 检测

利用基因重组技术,成功地将编码这5种候选蛋白的基因片段克隆至大肠杆菌表达载体中。分别摸索各蛋白的最佳诱导表达条件。进

行放大表达后,镍柱亲和层析纯化各重组蛋白。SDS-PAGE检测纯化后的重组蛋白,发现各重组蛋白的条带较单一,杂蛋白含量少,表明各重组蛋白纯化成功(图3-a)。

进一步使用Western Blot的方法检测各重组蛋白与多聚组氨酸标签单抗结合的特异性,结果显示,重组蛋白VpadF、IMPDH、OppA、OABC、TolC、EF-Tu均可被多聚组氨酸标签单抗识别,且条带单一。其中VpadF有部分降解条带,可能

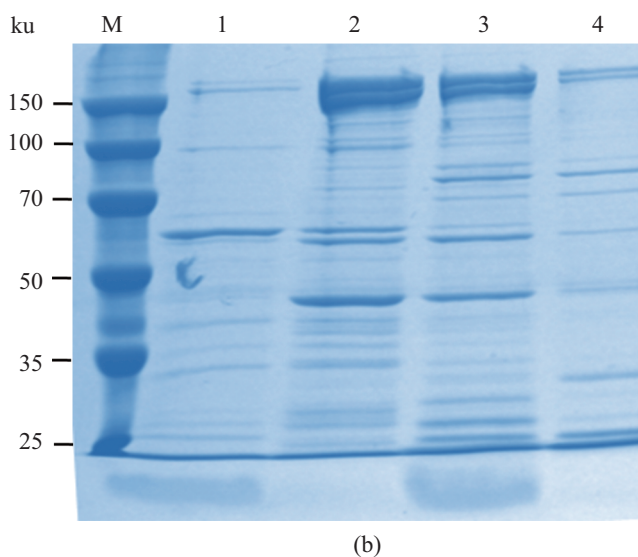
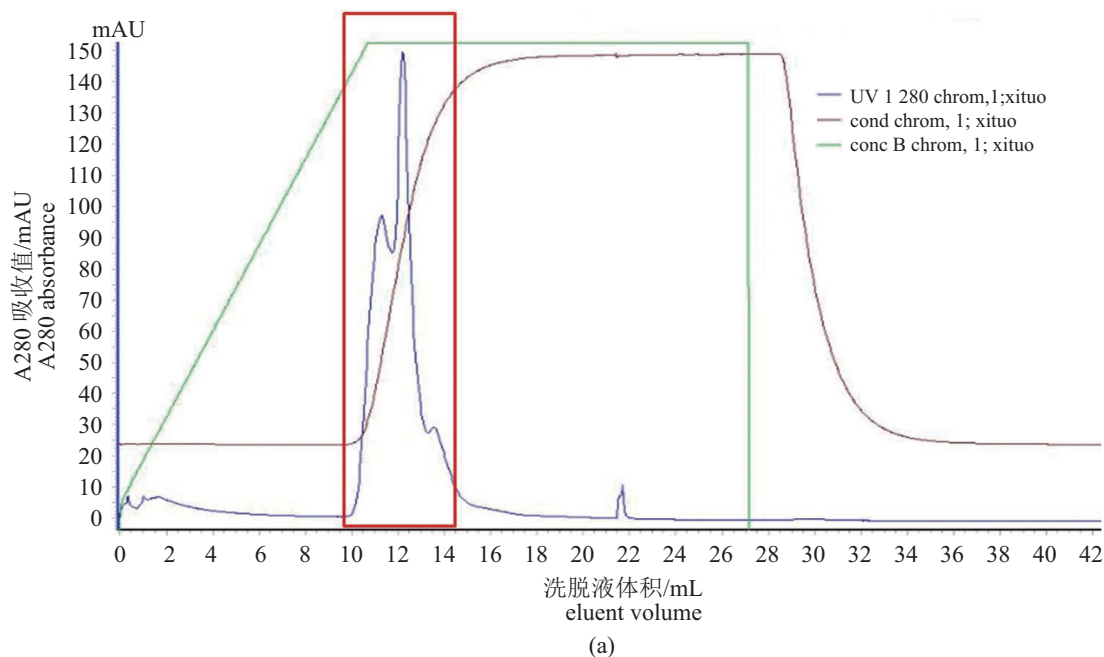


图2 NY-172 外膜蛋白肝素亲和层析纯化结果

(a)肝素亲和纯化层析的峰图,红框内标注的是洗脱峰;(b)洗脱样品SDS-PAGE检测,1-4分别为收集的四管洗脱峰样品

Fig. 2 Identification of NY-172 outer membrane heparin binding proteins by using heparin affinity chromatography

(a) the peak figure of heparin affinity chromatography purification, the elution peak was indicated by red box; (b) SDS-PAGE of the elution, the sample lane 1-4 corresponding to four tubes of the elution peak, respectively

表 2 候选蛋白质谱鉴定及生物信息学分析

Tab. 2 Identified candidate proteins by mass spectrum and bioinformatics analysis

蛋白名称 protein name	质谱鉴定到的肽段数量 identified peptides number	分子量/ku molecular weight	是否预测为胞外蛋白 whether predicted as cell surface protein
peptide ABC transporter substrate-binding protein(OppA)	8	60.8	是
elongation factor Tu (EF-Tu)	5	43.1	是
inosine-5-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)	46	51.9	是
TolC family protein (TolC)	29	48.9	是
oligopeptide ABC transporter(OABC)	8	63.5	是

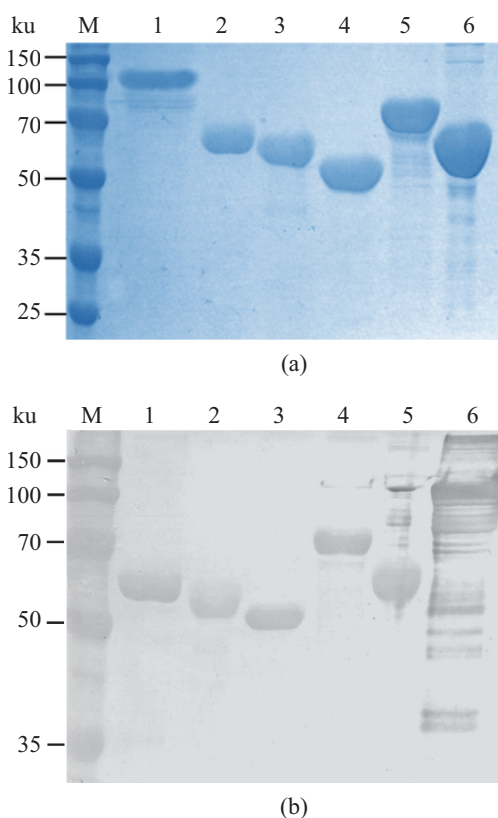


图 3 各重组蛋白的纯化及 Western Blot 检测结果

Fig. 3 Purified recombinant proteins (a) and the result of Western Blot assay (b)

(a) M. marker, 1. VpadF, 2. OppA, 3. TolC, 4. EF-Tu, 5. OABC, 6. IMPDH; (b) M. marker, 1. OppA, 2. TolC, 3. EF-Tu, 4. OABC, 5. IMPDH, 6. VpadF

由于蛋白的冻融所引起, 但仍以目的条带为主, 可被用于后续的功能验证(图3-b)。

2.4 间接免疫荧光分析结果

为了进一步验证结合蛋白, 通过间接免疫荧光试验观察纯化的重组蛋白与Hela细胞的黏附能力。结果显示, IMPDH、EF-Tu和OppA组Hela细胞表面荧光较明显, 与阳性对照VpadF组

结果类似, 说明它们与细胞结合的能力较强; TolC组与BSA组、PBS缓冲液组结果相似, 未见绿色荧光, 而OABC组荧光强度极弱, 说明重组蛋白OABC、TolC蛋白基本没有黏附Hela细胞能力(图版)。

2.5 重组蛋白抑制VP对Hela细胞的黏附

为了进一步评价各蛋白在VP黏附进程中发挥的作用, 在VP黏附Hela细胞前加入各重组蛋白孵育Hela细胞。根据各组细菌的黏附率, 判断各重组蛋白能否封闭细胞表面的黏附受体。使用单因素方差分析对各组VP黏附率结果进行统计学分析, 发现IMPDH组、阳性对照VpadF组的VP黏附率极显著性低于对照组BSA组, EF-Tu组、OppA组黏附率显著低于BSA组; TolC组、OABC组VP黏附率与BSA组的黏附率无显著性差异(图4)。这一结果与间接免疫荧光试验的结果相一致。说明重组IMPDH、OppA和EF-Tu蛋白竞争性地封闭了Hela细胞表面的VP结合位点, 导致VP与宿主细胞的黏附能力下降, 这三个蛋白本身参与了VP的黏附过程。

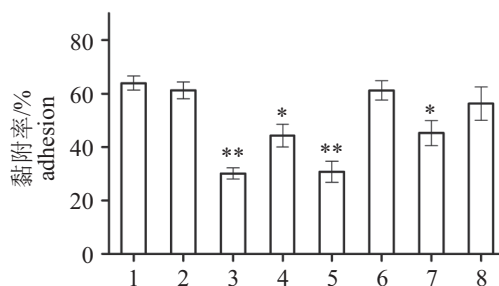


图 4 各重组蛋白抑制NY-172与Hela细胞黏附的结果

Fig. 4 Recombinant proteins inhibit the adhesion of NY-172 to Hela cells

1. DMEM, 2. BSA, 3. VpadF, 4. EF-Tu, 5. IMPDH, 6. TolC, 7. OppA, 8. OABC; *. $P < 0.05$

3 讨论

病原菌可与上皮细胞等多种细胞的表面结构进行黏附,进而发生侵袭、定植。其中,位于细胞外基质中的蛋白聚糖由于所处位置的独特性及结构多样性等特点,是许多病原菌黏附宿主细胞的重要表面受体^[18]。本研究中,首次发现外源性肝素可显著竞争性抑制VP对宿主细胞的黏附,表明肝素是VP黏附的重要细胞表面受体。革兰氏阴性细菌的外膜定位于细菌的最外侧,因此我们推测VP的外膜蛋白可能是细菌与肝素结合的主要组分。进一步采用肝素亲和层析技术垂钓到一些VP外膜蛋白。

对初步筛选到的这些蛋白进行鉴定时,发现IMPDH、EF-Tu、OppA蛋白均可结合到Hela细胞表面;同时重组IMPDH非常显著地竞争性抑制了VP对Hela细胞的黏附,而重组EF-Tu、OppA的抑制效果也比较明显,提示IMPDH、EF-Tu、OppA蛋白是VP的黏附蛋白,其中IMPDH可能是主要的黏附因子。

OppA是一种底物转运结合蛋白肽,在唾液杆菌(*Lactobacillus salivarius*)中OppA也被鉴定为黏附因子,并且其受体就是细胞外基质中的肝素^[18]。而EF-Tu和IMPDH也被报道参与了病原菌与宿主的黏附过程^[19]。EF-Tu在早先仅仅被认为是一种延伸因子,参与细菌的蛋白质翻译过程^[20],但最近的研究发现,它同时存在于细菌表面参与细菌黏附过程。如在鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)中发现EF-Tu与宿主细胞表面纤连蛋白(fibronectin)可以结合^[21]。在猪链球菌(*Streptococcus suis*)中,发现蛋白IMPDH、EF-Tu均是位于细菌表面的黏附因子,其宿主受体是层粘连蛋白(laminin)和纤连蛋白^[19],而纤连蛋白、层粘连蛋白均被报道具有结合肝素的活性^[22]。由此我们可以推测:在VP黏附到宿主细胞表面的过程中,肝素充当了中间桥梁的作用:IMPDH、EF-Tu首先与肝素结合后,由肝素介导与纤连蛋白或层粘连蛋白进一步发生紧密结合。为了证实这一推测,今后还需要进一步深入开展相关分子机制研究。

综上所述,本研究首次对VP与宿主细胞表面肝素的相互作用机制进行了探究,筛选并鉴定出OppA、EF-Tu、IMPDH蛋白是VP的潜在黏附因子,其中IMPDH可能是其主要的黏附因子。目前已有报道肝素能够显著降低肠致病性

大肠埃希菌(EPEC)、金黄色葡萄球菌等病原菌对大鼠肠道上皮细胞的黏附,同时促进益生菌鼠李糖乳杆菌的生物被膜的形成,达到了增强大鼠对肠道致病菌的抵抗能力、改善其消化道菌群健康水平的良好效果^[23]。这也提示我们,使用肝素类糖胺聚糖同样也可作为防范、治疗副溶血弧菌感染的新手段。本论文研究结果有助于深入揭示VP的致病机制,为后续研发新型预防及治疗VP感染的药物奠定了前期基础。

参考文献:

- [1] 李晶娇,薛峰,曾德新,等.副溶血弧菌毒力因子的研究进展[J].畜牧与兽医,2014,46(12):116-119.
Li J J, Xue F, Zeng D X, et al. Advances of study on the virulence factor of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 46(12): 116-119(in Chinese).
- [2] 杨芳,李秀娟,徐保红.副溶血弧菌分子致病机制研究进展[J].中华疾病控制杂志,2010,14(6):562-565.
Yang F, Li H J, Xu B H. Advances of study on molecule pathogenic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2010, 14(6): 562-565(in Chinese).
- [3] 杨振泉,焦新安.副溶血弧菌毒力因子及其致病机理的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2008,24(11):1070-1073.
Yang Z Q, Jiao X A. Advances of study on infection mechanism and virulence factor of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(11): 1070-1073(in Chinese).
- [4] 茆丹.不同来源副溶血弧菌分子分型及其毒力基因筛查[D].上海:上海交通大学,2014.
Mao D. Molecular typing and virulence genes screening of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2014 (in Chinese).
- [5] Nakasone N, Iwanaga M. Pili of a *Vibrio Parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(1): 61-69.
- [6] Chakrabarti M K, Sinha A K, Biswas T. Adherence of *Vibrio Parahaemolyticus* to rabbit intestinal epithelial cells in vitro[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 84(1): 113-117.
- [7] Liu M, Chen S. A novel adhesive factor contributing to

- the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 14449.
- [8] 高宁国, 程秀兰, 杨敬, 等. 肝素结构与功能的研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 4-13.
- Gao N G, Cheng X L, Yang J, *et al.* Progress in heparin structure and function[J]. Progress in Biotechnology, 1999, 19(5): 4-13(in Chinese).
- [9] Fallgren C, Andersson A, Ljungh A. The role of glycosaminoglycan binding of *Staphylococci* in attachment to eukaryotic host cells[J]. Current Microbiology, 2001, 43(1): 57-63.
- [10] Arciola C R, Bustanji Y, Conti M, *et al.* *Staphylococcus Epidermidis*-fibronectin binding and its inhibition by heparin[J]. Biomaterials, 2003, 24(18): 3013-3019.
- [11] Frick I M F, Schmidtchen A, Sjöbring U. Interactions between M proteins of *Streptococcus Pyogenes* and glycosaminoglycans promote bacterial adhesion to host cells[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(10): 2303-2311.
- [12] Noel G J, Love D C, Mosser D M. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus Influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans[J]. Infection and Immunity, 1994, 62(9): 4028-4033.
- [13] Menozzi F D, Pethe K, Bifani P, *et al.* Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1379-1386.
- [14] 陈祥娥. Heparosan的提取分离及其对肠道菌作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- Chen X E. Study on the extraction and isolation of heparosan and its effects on intestinal bacteria[D]. Ji'nan: Shandong University, 2012 (in Chinese).
- [15] 王忠, 邓灯, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌外膜蛋白抗原性分析[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 455-459.
- Wang Z, Deng D, Cheng S F, *et al.* Antigenicity of membrane proteins in pathogenic bacterium *Vibrio ichthyenteri*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(8): 455-459(in Chinese).
- [16] 周丽, 刘洪明, 战文斌, 等. 鳃弧菌、溶藻胶弧菌外膜蛋白的分离及特性[J]. 中国水产科学, 2003, 10(1): 31-35.
- Zhou L, Liu H M, Zhan W B, *et al.* Isolation and characteristics of major outer membrane proteins of aquatic pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(1): 31-35(in Chinese).
- [17] 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 38-43.
- Du X J, Zhang W W, Sun W Y, *et al.* Expression pattern and recombinant expression of tropomyosin gene of *Litopenaeus vannamei*[J]. Marine Fisheries Research, 2009, 30(4): 38-43(in Chinese).
- [18] Martín R, Martín C, Escobedo S, *et al.* Surface glycosaminoglycans mediate adherence between hela cells and *Lactobacillus Salivarius* Lv72[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 210.
- [19] Li Q, Liu H Z, Du D C, *et al.* Identification of novel laminin- and fibronectin-binding proteins by far-western blot: capturing the adhesins of *Streptococcus suis* type 2[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 82.
- [20] Kraal B, Lippmann C, Kleanthous C. Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu[J]. Folia Microbiologica, 1999, 44(2): 131-141.
- [21] Dallo S F, Zhang B L, Denno J, *et al.* Association of *Acinetobacter baumannii* Ef-tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin[J]. The Scientific World Journal, 2012, 2012: 128705.
- [22] Skubitz A P, McCarthy J B, Charonis A S, *et al.* Novel synthetic heparin binding peptides of laminin and fibronectin which promote the adhesion of melanoma cells[J]. Invasion & Metastasis, 1989, 9(2): 89-101.
- [23] 段荣帅. 肝素对肠道菌及肠道菌群的作用与机制[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- Duan R S. Effects of heparin on intestinal bacteria and intestinal microbiota and the action mechanism[D]. Ji'nan: Shandong University, 2013 (in Chinese).

Screening and identification of the heparin-binding associated adhesive proteins of *Vibrio parahaemolyticus*

YANG Yanan¹, WANG Jingting¹, CHEN Meng¹,
GENG Xuyun², YUAN Zengzhi^{1*}, SUN Jinsheng^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science,
Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

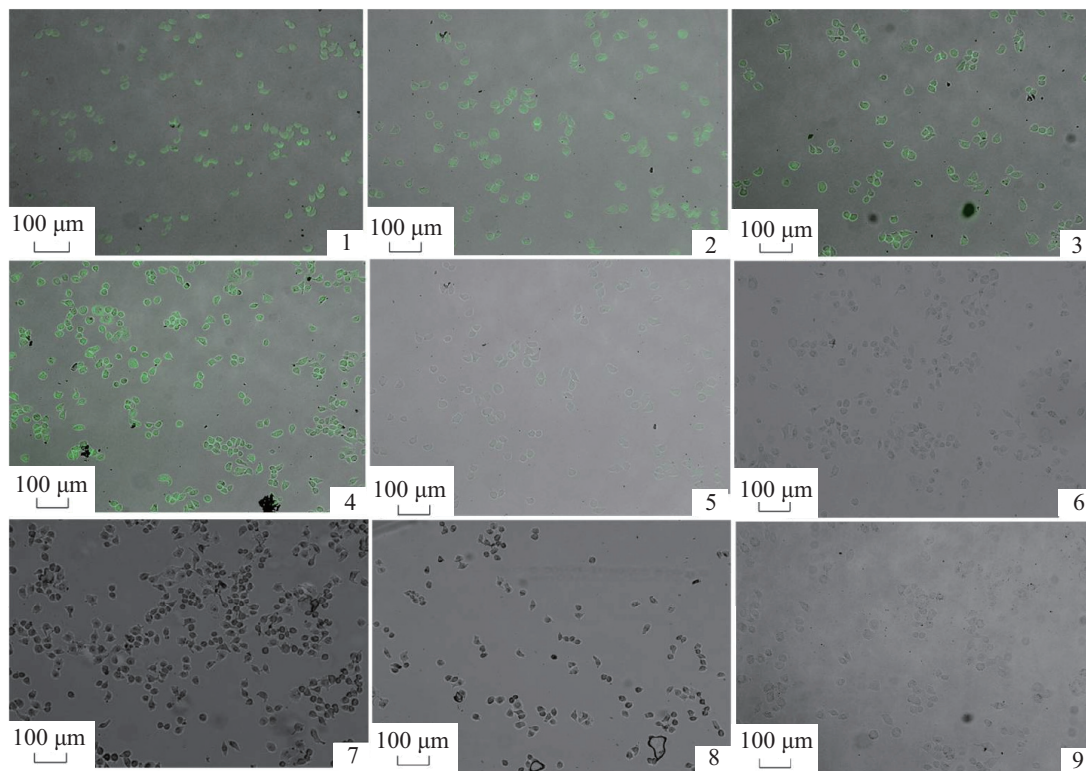
2. Tianjin Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Tianjin 300221, China)

Abstract: Adhesins are critical to the infectious pathogens, thus identification of novel adhesins is very crucial to understanding the pathogen's infection mechanism. In this study, we demonstrated that heparin can competitively inhibits the adhesion of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) to Hela cells, which indicates heparin in ECM could be the cell receptor of VP. Using heparin-sepharose affinity chromatography, six heparin-binding VP out-membrane proteins (OMPs) are selected. The six corresponding recombinant proteins were expressed and purified. According to the result of function verification test, recombinant protein IMPDHEF-Tu and OppA are capable of binding to the Hela cells surface. Furthermore, they can inhibit the adhesion of VP to Hela cells significantly. Our research shows that the three OMPs are candidates of VP adhesins.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; heparin; out-membrane proteins; adhesins

Corresponding author: YUAN Zengzhi. E-mail: skyzyz@mail.tjnu.edu.cn; SUN Jinsheng. E-mail: skysjs@mail.tjnu.edu.cn

Funding projects: the National Basic Research Program (973) of China (2012CB114405); National Natural Science Foundation of China (31402322); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (15JCQNJC46400); Tianjin Normal University Doctoral Research Foundation (52XB1412)



图版 间接免疫荧光实验结果

1. VpadF, 2. IMPDH, 3. EF-Tu, 4. OppA, 5. OABC, 6. TolC, 7. BSA, 8. PBS缓冲液, 9. 未经处理的Hela细胞

Plate The result of indirect immuno-fluorescence assay

1. VpadF, 2. IMPDH, 3. EF-Tu, 4. OppA, 5. OABC, 6. TolC, 7. BSA, 8. PBS buffer, 9. untreated HeLa cells