微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

Mar. 20, 2017, 44(3): 673−679
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160204

研究报告

拟态弧菌 OmpU 蛋白在草鱼肠组织中互作蛋白的筛选鉴定

胡丹丹　肖宁　戚莉芳　李槿年*

(安徽农业大学动物科技学院 人兽共患病重点实验室　安徽 合肥　230036)

摘　要：【目的】为了确定草鱼肠组织蛋白中能与拟态弧菌 OmpU 黏附素蛋白发生互作的蛋白。【方法】在前期构建重组表达质粒 pET-32a-OmpU 基础上，通过 IPTG 诱导表达及亲和层析纯化获得可溶性 His-OmpU 融合蛋白，经 Western blot 分析显示该重组融合蛋白与 OmpU 多克隆抗体具有良好的反应原性。以 His-OmpU 融合蛋白为诱饵蛋白，利用 His-tag pull down 试验筛选草鱼肠组织蛋白中与 OmpU 黏附素蛋白结合的蛋白，并经 SDS-PAGE 分离、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)鉴定以及 Mascot 与蛋白数据库检索。【结果】共鉴定出 5 个体外互作蛋白，分别为 α-肌动蛋白 2 (α-Actin 2)、细丝蛋白 A (Filamin A)、α-辅肌动蛋白 4 (α-Actinin 4)、转胶蛋白 2 (又称肌动蛋白结合蛋白 2，Transgelin-2)和调宁蛋白 2 (Calponin-2)。【结论】GO 功能注释分析显示，这些互作蛋白属于细胞骨架蛋白和细胞骨架调节蛋白，在病原菌的黏附、内化和致病中起着重要作用。研究结果为后期研制黏附拮抗剂和探究拟态弧菌分子致病机理奠定了基础。

关键词：拟态弧菌，OmpU 黏附素蛋白，肠组织，互作蛋白

Screening and identification of interacting intestinal proteins of *Ctenopharyngodon idella* with OmpU of *Vibrio mimicus*

HU Dan-Dan　XIAO Ning　QI Li-Fang　LI Jin-Nian*

(Key Laboratory of Zoonoses, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] In order to determine interaction between outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio mimicus* and the proteins of intestinal tissue of grass carp. **[Methods]** By construction of recombinant expression plasmid pET-32a-OmpU, we obtained the soluble fusion His-OmpU protein through IPTG induction and affinity purification. Western blot analysis showed the expressed His-OmpU protein could be combined by polyclonal antibody of OmpU. The proteins of intestinal tissue of grass carp interacting with OmpU was screened by His-tag pull down assay and identified by LC-MS/MS followed by SDS-PAGE. Based on searches of bioinformatics by Mascot software and protein database. **[Results]** Five proteins were verified which can interact with the OmpU *in vitro*, including α-actin 2, Filamin A, α-actinin 4, Transgelin-2, Calponin-2. **[Conclusion]** GO

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272696)
***Corresponding author:** Tel: 86-551-65786020; Fax: 86-551-65785833; E-mail: lijinnian2000@163.com
Received: March 10, 2016; **Accepted:** April 19, 2016; **Published online** (www.cnki.net)**:** June 08, 2016
基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31272696)
*通讯作者：Tel：86-551-65786020；Fax：86-551-65785833；E-mail：lijinnian2000@163.com
收稿日期：2016-03-10；接受日期：2016-04-19；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2016-06-08

annotation indicated that these proteins are cytoskeletal protein and regulatory protein of cytoskeletal which play an important role in adhesion of pathogens, internalization and pathogenicity. These results provided a basis for studies on future development of adhesion antagonist and exploration the molecular pathogenesis of *V. mimicus*.

Keywords: *Vibrio mimicus*, Outer membrane protein U, Intestinal tissue, Interaction protein

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)是水产养殖生产中常见的一种肠道病原菌，主要经肠黏膜感染引起多种水生动物，尤其是鱼类的腹水病，严重威胁水产养殖业的健康发展[1-4]。目前鱼类腹水病的防治方法仍以内服抗菌药物和外用化学消毒剂为主，但是由此带来的各种副作用，诸如细菌耐药性、水环境污染以及水产品质量安全危害日益明显。因此，探索拟态弧菌所致鱼类腹水病的防治新策略显得十分必要。

前期研究已证实肠道是拟态弧菌黏附定殖的主要靶器官，外膜蛋白 U (Outer membrane protein U，OmpU)是该菌的重要黏附素[5-7]。OmpU 黏附素蛋白介导拟态弧菌黏附定殖于肠黏膜表面是引发鱼类腹水病的关键起始环节，但是该黏附素蛋白在肠组织中的相互作用蛋白仍不清楚。在探明 OmpU 黏附素蛋白在肠组织蛋白中的互作蛋白的基础上，筛选能与肠组织互作蛋白相结合的黏附拮抗肽，进而研制成黏附拮抗剂，以消减拟态弧菌毒力的作用，是防治鱼类腹水病的一个全新模式。

在后基因组时代，随着研究蛋白质间相互作用及作用网络成为蛋白质组学的热门课题，蛋白质相互作用的研究方法和技术也取得了长足发展。目前研究蛋白质相互作用的方法很多，其中 Pull down 技术(包括 His-tag pull down 和 GST-tag pull down)具有特异性较强、操作简便、不需标记物和染料等优点，已被广泛应用于相互作用蛋白的筛选[8-10]。His-tag pull down 试验原理是首先将诱饵蛋白(His-融合蛋白)通过金属钴对 His 标签的高亲和力而固定到亲和树脂上，使之作为与目的蛋白亲和的支持物；然后当含有目的蛋白混合溶液经过柱子时，目的蛋白与诱饵蛋白相互作用而固定到亲和树脂上；最后通过对结合物洗脱和 SDS-PAG 电泳分离，从而筛选出相应的未知目的蛋白或获知蛋白间是否相互作用。本研究在制备拟态弧菌 His-OmpU 融合蛋白的基础上，利用 His-tag pull down 试验在草鱼肠组织中筛选与 OmpU 黏附素蛋白结合的蛋白质，并经 SDS-PAGE 分离和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析，确定其互作蛋白，为后期研制黏附拮抗剂和探究拟态弧菌分子致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Ni-Charged Resin 亲和层析柱、Bradford 蛋白检测试剂盒、乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40，NP-40)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶(Aprotinin)、亮抑酶肽(Leupetin)，北京天根生化科技有限公司；Pierce Pull-Down PolyHis Protein: Protein Interaction Kit，美国 Themo Fisher Scientific 公司；3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)、载体两性电解质(Bio-Lyte)、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体，伯乐生命医学产品有限公司。

LB 培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母提取物 5，氯化钠 10，pH 7.0。

LRH-250 生化培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；JY92-Ⅱ超声波细胞破碎机，宁波新芝科器研究所；TS-100 脱色摇床，北京市新技术应用研究所；医用低温保存箱 DW-25W198，海尔特种电器有限公司；培清 JS-680D 全自动凝胶成像系统分析仪，上海培清科技有限公司。

1.2 His-OmpU 融合蛋白的诱导表达

将含重组表达质粒 pET-32a-OmpU 的 *E. coli* BL21(DE3)单菌落接种于 3 mL 含 100 mg/L Amp 的 LB 培养液中，37 °C、150 r/min 振荡培养过夜。按

1:100 比例(体积比)转接于 10 mL 含 100 mg/L Amp 的LB培养液中，37 °C、150 r/min振荡培养至细菌对数生长期，加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG，25 °C、90 r/min 诱导 8 h，12 000 r/min 离心 3 min 收集菌体。用 PBS 重悬菌体后冰上超声破碎，4 °C、12 000 r/min 离心 20 min，收集上清进行 SDS-PAGE 分析(浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%)。

1.3 His-OmpU 融合蛋白的纯化与鉴定

大量表达 His-OmpU 融合蛋白，超声破碎诱导表达的菌体，收集含可溶性蛋白的上清液，以 Ni-Charged Resin 亲和层析柱纯化融合蛋白，并用超滤浓缩管离心(4 000 r/min，45 min)浓缩和除盐 2 次。采用 Bradford 蛋白检测试剂盒测定纯化后的融合蛋白浓度，并以 OmpU 多克隆抗体(本实验室制备)为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，对纯化后的 His-OmpU 融合蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.4 草鱼肠组织总蛋白的制备

称取 300 mg 新鲜草鱼肠组织剪碎后，加入液氮充分研磨成粉末状，均等分成 3 份，采用以下 3 种方法提取肠组织总蛋白。

1.4.1 NP-40 裂解法：取 2 mL 预冷的 NP-40 裂解液加入 100 mg 研磨好的肠组织中，冰上匀浆 2 h，12 000 r/min 离心 15 min 后取上清，SDS-PAGE 分析蛋白提取效果并用蛋白检测试剂盒测定其浓度。

1.4.2 含蛋白酶抑制剂的 **NP-40** 裂解法：取 2 mL 预冷的含蛋白酶混合抑制剂(1 mmol/L PMSF，2 mg/L Aprotinin，5 mg/L Leupetin)的 NP-40 细胞裂解液加入 100 mg 研磨好的肠组织中，冰上匀浆 2 h，12 000 r/min 离心 15 min 后取上清，SDS-PAGE 分析蛋白提取效果并用核酸蛋白测定仪测定其浓度。

1.4.3 丙酮沉淀法：100 mg 研磨好的肠组织中加入 500 μL 预冷的裂解液(7 mol/L 尿素、4% CHAPS、1% DTT、0.5% Bio-Lyte、100 mmol/L PMSF)冰上匀浆 2 h，12 000 r/min 离心 15 min 后沉淀用 1.2 mL 丙酮重悬，−20 °C 过夜。次日取出，12 000 r/min 离心 15 min 后用裂解液溶解沉淀，再离心收集上清液，SDS-PAGE 分析蛋白提取效果并用核酸蛋白测定仪测定其浓度。

1.5 His-tag pull down 试验

准备 3 个 Pull down 过滤柱芯，分别标记为 His-OmpU Pull down 试验组(树脂+His-OmpU+肠组织蛋白)、诱饵蛋白对照组(树脂+His-OmpU，消除肠组织蛋白与诱饵蛋白中 His 标签的非特性结合而产生的假阳性，同时作为验证树脂与 His-OmpU 成功结合的阳性对照)和猎物蛋白对照组(树脂+猎物蛋白，消除肠组织蛋白与树脂非特异性结合而产生的假阳性)。吸取 100 μL 混合均匀的钴化树脂浆液至每一旋转柱中，加入 400 μL His-OmpU 诱饵蛋白液(猎物蛋白对照组不加)，于 4 °C 水平摇床 50 r/min 作用 30 min，使诱饵蛋白与树脂充分结合。用含 10 mmol/L 咪唑的 TBS 洗涤缓冲液 4 °C 离心(3 700 r/min，1 min)洗柱 5 次，以除去未结合的诱饵蛋白。取 400 μL 浓度约为 12 g/L 的肠组织总蛋白液加入柱中，4 °C 水平摇床上 70 r/min 摇晃孵育 1 h，以形成树脂-His-OmpU-肠组织蛋白复合物，用上述洗涤缓冲液洗柱 5 次，除去未结合的肠组织蛋白，最后用 300 μL 含 300 mmol/L 咪唑的 TBS 洗脱缓冲液将 OmpU-肠组织蛋白复合物与树脂分离，收集洗脱液，经 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%)分离差异蛋白条带。

1.6 差异蛋白的质谱鉴定与功能分析

经过 3 次重复试验后，从 SDS-PAGE 胶上切取各差异蛋白条带，分装至 EP 管送交杭州景杰生物科技有限公司进行 LC-MS/MS 鉴定。获得的质谱数据文件用 Mascot 软件检索 UniPort 数据库初步鉴定蛋白质。检索参数设置：物种分类为草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)和斑马鱼(*Danio rerio*)，裂解酶为胰蛋白酶，固定修饰为半胱氨酸经碘乙酰胺修饰，酶漏切位点数为 1，母离子质量允许误差为 2 U，子离子质量允许误差为 0.8 U。根据蛋白分子量(实验所得分子量与理论分子量是否吻合)、Mascot 得分(>38)和蛋白序列覆盖率(鉴定出的可信

肽段相对于整个蛋白肽段的比率，>10%)等指标，进一步对检索结果进行过滤，去除可疑蛋白质，确定 OmpU 黏附素蛋白的互作蛋白，并进一步做 GO 功能注释分析。

2 结果与分析

2.1 His-OmpU 融合蛋白的表达、纯化与鉴定

含重组表达质粒 pET-32a-OmpU 的 *E. coli* BL21(DE3)经诱导表达后，取全菌蛋白液和超声裂解后的上清液做 SDS-PAGE 分析，电泳结果显示全菌蛋白液和上清液部分在分子量约为 55.6 kD 处均出现一条浓染蛋白带(图 1A，泳道 1 和 2)，与预期的 His-OmpU 融合蛋白理论值一致(OmpU 蛋白大小约为 35.4 kD，His 标签蛋白大小约为 20.2 kD)。该融合蛋白经纯化及浓缩后，获得纯度为 95%、浓度为 1.2 g/L 的纯化蛋白(图 1A，泳道 3)。经 Western blot 鉴定，纯化后的 His-OmpU 融合蛋白能与 OmpU 多克隆抗体发生特异性结合反应，在 55.6 kD 处出现一条免疫反应条带(图 1B 泳道 1)，表明重组 OmpU 蛋白具有良好的纯度和反应原性。

2.2 草鱼肠组织总蛋白制备方法的比较

使用蛋白检测试剂盒测得不同方法提取的草鱼肠组织总蛋白浓度分别为 11.81 (含蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解法)、10.05 (NP-40 裂解法)和 1.71 g/L (丙酮沉淀法)。SDS-PAGE 结果也显示，丙酮沉淀法提取的蛋白量少，条带不清晰(图 2，泳道 2 和 3)；两种裂解法提取的蛋白量均较大，但以含蛋白酶抑制剂的裂解法提取效果最好，分离条带清晰，无蛋白降解现象(图 2，泳道 1 和 4)，可用于后续的 His-tag pull down 试验。

2.3 His-tag pull down 筛选及复合蛋白的 SDS-PAGE 分离

以 His-OmpU 融合蛋白为诱饵蛋白从草鱼肠组织总蛋白中捕获互作蛋白。SDS-PAGE 分析显示，与诱饵蛋白对照组(图 3，泳道 2)和猎物蛋白对照组(图 3，泳道 4)蛋白带比较，发现 Pull down 试验组出现了 5 条明显的差异蛋白条带(图 3 泳道 3，A−E 为差异蛋白条带，F 为 His-OmpU 融合蛋白)，同时在肠组织总蛋白中也存在与差异条带位置相同的蛋白条带(图 3，泳道 5)，说明这些差异蛋白条带是肠组织蛋白裂解液中由 OmpU 黏附素蛋白 Pull down 下来的成分。但是 D 条带(图 3，泳道 3)下面出现的一条蛋白条带在诱饵蛋白对照组(图 3，泳道 2)中也有出现，因此不属于差异条带。

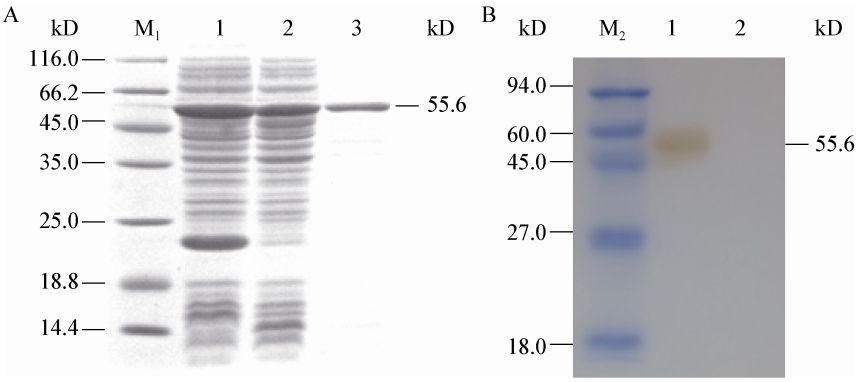

图 1 His-OmpU 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Figure 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of the His-OmpU protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)

注：A：M_1：蛋白质分子量标准；1：诱导后的全菌蛋白；2：诱导后的上清蛋白；3：His-OmpU 纯化蛋白. B：M_2：预染蛋白质分子量标准；1：His-OmpU 纯化蛋白的免疫印迹反应；2：His 标签蛋白的免疫印迹反应.

Note: A: M_1: Protein molecular standard; 1: Whole-cell protein of induced pET-32a-OmpU/BL21; 2: Supernatant protein of induced pET-32a-OmpU/BL21; 3: Purified His-OmpU protein. B: M_2: Prestained protein molecular standard; 1: Western blot of purified His-OmpU protein with OmpU polyclonal antibody; 2: Western blot of His tagged protein with OmpU polyclonal antibody.

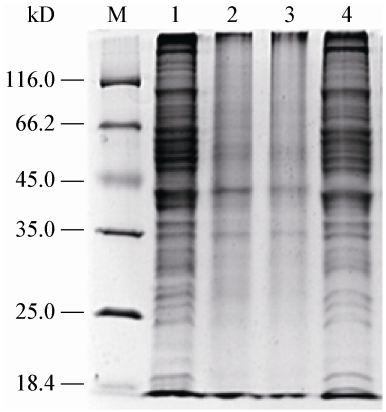

图 2 不同方法提取的肠组织总蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of total proteins of intestine tissue of *Ctenopharyngodon idella* by different extraction methods

注：M：蛋白质分子量标准；1：含蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解法提取的总蛋白；2、3：丙酮沉淀法提取的总蛋白；4：NP-40 裂解法提取的总蛋白.

Note: M: Protein molecular standard; 1: Total proteins extracted with NP-40 cleavage containing protease inhibitor; 2, 3: Total proteins extracted with acetone; 4: Total proteins extracted with NP-40 cleavage.

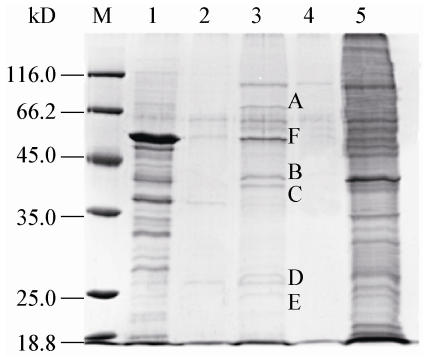

图 3 Pull down 试验筛选 His-OmpU 互作蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of His-OmpU interaction proteins screened by pull-down assay

注：M：蛋白质分子量标准；1：诱导后的全菌蛋白；2：诱饵蛋白对照组；3：His-OmpU pull down 试验组；4：猎物蛋白对照组；5：草鱼肠组织总蛋白.

Note: M: Protein molecular standard; 1: Total bacterial protein after induction; 2: Bait protein control; 3: Pull down assay; 4: Prey protein control; 5: Total proteins of intestinal tissue of *Ctenopharyngodon idella*.

2.4 OmpU 黏附素蛋白互作蛋白的质谱鉴定与分析

5 条差异蛋白条带的质谱数据提交至 UniPort 数据库进行检索，根据蛋白分子量、Mascot 得分(>38)和蛋白序列覆盖率(>10%)等指标，对检索结果进行综合评价，结果在草鱼肠组织蛋白中共鉴定到 5 个与 OmpU 黏附素蛋白存在体外互作的蛋白，其基本信息见表 1。GO 功能注释分析结果显示，α-肌动蛋白 2 为细胞骨架蛋白，细丝蛋白 A、α-辅肌动蛋白 4、转胶蛋白 2 和调宁蛋白 2 均为细胞骨架调节蛋白，它们除参与许多重要的细胞活动外，在病原菌的黏附、内化和致病过程中也发挥重要作用。

3 讨论

蛋白组学研究过程包括蛋白样品制备、筛选、分离和生物质谱鉴定。His-tag pull down 技术是体外筛选与已知融合蛋白相互作用的未知蛋白的有效方法，而蛋白样品制备是蛋白筛选成功与否的关键起始环节。对此，本研究通过

表 1 差异蛋白条带 LC-MS/MS 鉴定数据库检索结果

Table 1 Database search results for LC-MS/MS identification of the differential protein bands

蛋白条带 Protein band	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	分子量 MW (kD)	等电点 PI	评分 Score	覆盖率 Coverage (%)
A	细丝蛋白 A (Filamin A)	E9QI62	E9QI62	6.04	127.7	127.7
B	α-肌动蛋白 2 (α-Actin 2)	Q6DHS1	Q6DHS1	5.39	302.4	302.4
C	调宁蛋白 2 (Calponin-2)	F1QLB7	F1QLB7	7.81	45.4	45.4
D	α-辅肌动蛋白 4 (α-Actinin 4)	Q7SYE2	Q7SYE2	7.46	593.5	593.5
E	转胶蛋白(Transgelin-2)	Q0P4B4	Q0P4B4	8.69	66.3	66.3

优化重组质粒 pET-32a-OmpU 的表达条件获得了可溶性 His-OmpU 融合蛋白，由于可溶性蛋白的结构更加接近于蛋白的天然结构，以该可溶性蛋白作为诱饵蛋白，有利于提高 Pull down 筛选试验的特异性。其次，比较了 3 种不同方法提取草鱼肠组织总蛋白的效果，结果发现含蛋白酶抑制剂的 NP-40 裂解法的提取效果最好，原因是蛋白酶混合抑制剂(PMSF、Aprotinin 和 Leupetin)能有效地抑制蛋白酶对蛋白质的水解作用，从而保证在制样过程中蛋白质不被降解，蛋白得率高、分离条带清晰，可以满足 Pull down 筛选试验对猎物蛋白的要求。此外，有关 His-tag pull down 试验的研究报道[11]多是采用少量 Ni^{2+}-NTA agarose beads 在 Eppendorf 管中进行小体积的 Pull down，而本研究采用 HisPur™钴化树脂柱使整个体系放大，更利于互作蛋白的结合和洗脱。

液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术结合了液相色谱对样品的高分离能力和串联质谱的高灵敏度，实现了对蛋白质混合样品及 SDS-PAGE 复杂条带的鉴定[12]。该技术最大的优点是对样品纯度要求不高，不仅可以测定蛋白质和肽段的分子量，还能获得肽段的序列标记及其侧链化学修饰等数据，使蛋白质鉴定结果准确可靠。因此，本研究利用上述优化的 His-tag pull down 试验结合 LC-MS/MS 技术，以 His-OmpU 为诱饵蛋白，首次从草鱼肠组织蛋白中初步鉴定到 5 个与拟态弧菌 OmpU 黏附素蛋白有潜在相互作用的蛋白(细丝蛋白 A、α-辅肌动蛋白 4、转胶蛋白 2 和调宁蛋白 2)，这些蛋白有望成为后期研制黏附拮抗剂和探究拟态弧菌分子致病机理的靶蛋白。但是，它们是否与 OmpU 黏附素蛋白有特异性结合并相互作用仍需通过免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation，Co-IP)方法加以验证。

病原菌对宿主细胞的侵袭包括黏附、内化和繁殖，最终引起细胞溶解和组织损伤。侵袭过程除与细菌表面的黏附素和侵袭素密切相关外，还与宿主靶细胞表面受体、细胞骨架和细胞内信号转导等有关。目前认为病原菌的侵袭机制有两种，一种是“拉链”机制，即细菌(如肠致病性大肠埃希菌、耶尔森菌、李斯特菌等)通过其黏附素与宿主细胞表面的受体(如整合素)直接结合，在结合处形成富含肌动蛋白骨架的黏附基板，促进细菌黏附，进而由肌动蛋白提供细胞“内吞力”，推动细菌在胞内和胞间运动，使感染得以扩散[13-14]。另一种为“触发”机制，即细菌(如沙门氏菌、志贺氏菌、单核细胞增多性李氏特菌等)与宿主细胞接触后，触发细胞内信号转导发生，细胞骨架重排，导致细菌被动地侵入宿主细胞[15-16]。本研究鉴定获得的 5 种 OmpU 黏附素蛋白互作蛋白中，α-肌动蛋白 2 是构成细胞骨架的重要蛋白质[17]；其余 4 种(细丝蛋白 A、α-辅肌动蛋白 4、转胶蛋白 2 和调宁蛋白 2)均属于肌动蛋白结合蛋白(Actin binding proteins，ABPs)。ABPs 不仅可通过其氨基端肌动蛋白结合结构域(Actin binding domain，ABD)与肌动蛋白羧基端结合，调节肌动蛋白发生聚合、成束或交联，还可以作为“脚手架”将细胞骨架蛋白与膜受体蛋白、信号蛋白连接，参与细胞骨架重排的信号转导过程[18-21]。由此推测，拟态弧菌经黏膜感染鱼体后，可能通过 OmpU 黏附素蛋白与肠黏膜表面多靶点的结合完成侵袭过程。一方面 OmpU 黏附素蛋白可与 α-肌动蛋白 2 直接或间接结合，使肌动蛋白骨架聚集形成黏附基板，完成侵入宿主细胞的第一步；另一方面 OmpU 黏附素蛋白可与上述 4 种肌动蛋白结合蛋白结合，触发细胞内一系列信号转导级联反应，导致细胞骨架重排，黏附细菌进入细胞内，进而繁殖产生毒素，损害组织细胞。

参 考 文 献

[1] Shen JY, Yin WL, Qian D, et al. Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(3): 89-92 (in Chinese)
沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 89-92

[2] Wang GL, Zheng TL, Jin S, et al. Preliminary studies on pathogen of ascites disease of cultured *Sparus macrocephelus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23(1): 33-35 (in Chinese)
王国良, 郑天伦, 金珊, 等. 黑鲷幼鱼腹水病病原菌[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 33-35

[3] Zhang X, Li YW, Mo ZQ, et al. Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquaculture, 2014, 432: 119-124
[4] Geng Y, Liu D, Han S, et al. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China[J]. Aquaculture, 2014, 433: 82-84
[5] Gao HH, Hou LT, Li JN, et al. EGFP marker of *Vibrio mimicus* and its dynamic distribution in infected *Ctenopharyngodon idella*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(4): 557-565 (in Chinese)
高会会, 侯立婷, 李槿年, 等. 拟态弧菌的绿色荧光蛋白标记及其在感染草鱼体内的动态分布[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 557-565
[6] Wang W, Hu DD, Li JN, et al. Adhesion function of OmpU protein from *Vibrio mimicus* and its role in virulence[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 731-740 (in Chinese)
王薇, 胡丹丹, 李槿年, 等. 拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能及所介导的致病作用[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 731-740
[7] Liu XQ, Gao HH, Xiao N, et al. Outer membrane protein U (OmpU) mediates adhesion of *Vibrio mimicus* to host cells via two novel N-terminal motifs[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119026
[8] de las Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interaction networks: unraveling the wiring of molecular machines within the cell[J]. Briefings in Functional Genomics, 2012, 11(6): 489-496
[9] Berggård T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions[J]. Proteomics, 2007, 7(16): 2833-2842
[10] Chai ZB, Zhang GL, Han JX. Application of GST-pull down technique in study on protein-protein interaction[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(10): 1354-1358 (in Chinese)
柴政斌, 张更林, 韩金祥. GST-pull down 技术在蛋白质相互作用中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(10): 1354-1358
[11] Lee WJ, Kim DU, Lee MY, et al. Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics[J]. Proteomics, 2007, 7(2): 206-214
[12] Yang Q, Wang D, Chang LL, et al. Progress in mass spectrometry and its application in proteomics[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(1): 239-246 (in Chinese)
杨倩, 王丹, 常丽丽, 等. 生物质谱技术研究进展及其在蛋白质组学中的应用[J]. 中国农学通报, 2015, 31(1): 239-246
[13] Caron E, Crepin VF, Simpson N, et al. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(1): 40-45
[14] Leo JC, Skurnik M. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*[A]//Linke D, Goldman A. Bacyerial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics: Advances in Experimental Medicine and Biology[M]. Netherlands: Springer, 2011, 715: 1-15
[15] Wang M. Role of integrins in bacterial pathogenesis[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2013, 41(4): 62-65 (in Chinese)
王敏. 整合素在细菌致病机制中的作用[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(4): 62-65
[16] Cossart P. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player[J]. Cellular Microbiology, 2000, 2(3): 195-205
[17] Grzanka D, Gagat M, Izdebska M. Actin is required for cellular death[J]. Acta Histochemica, 2013, 115(8): 775-782
[18] Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, et al. Structural basis of filamin A functions[J]. The Journal of Cell Biology, 2007, 179(5): 1011-1025
[19] Pelletier O, Pokidysheva E, Hirst LS, et al. Structure of actin cross-linked with α-actinin: a network of bundles[J]. Physical Review Letters, 2003, 91(14): 148102
[20] Daniel C, Lüdke A, Wagner A, et al. Transgelin is a marker of repopulating mesangial cells after injury and promotes their proliferation and migration[J]. Laboratory Investigation, 2012, 92(6): 812-826
[21] Hossain MM, Smith PG, Wu KC, et al. Cytoskeletal tension regulates both expression and degradation of h2-calponin in lung alveolar cells[J]. Biochemistry, 2006, 45(51): 15670-15683