

拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能及所介导的致病作用

王 薇, 胡丹丹, 李瑾年*, 刘雪芹

(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: 为了探明拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能, 利用同源重组技术敲除基因组中 *OmpU* 基因, 并构建其互补株, 再经组合 PCR 方法和序列测定, 证实了 *OmpU* 基因的缺失和互补。对野生株、缺失株和互补株进行了遗传稳定性、生长特性、生化特性、细胞黏附性、致病性等方面比较研究。结果显示, 缺失株具有遗传稳定性; 在相同的培养条件下, 与野生株相比, 突变株的培养特性和生化特性没有明显变化, 生长速率略减慢, 对实验草鱼的毒力降低了 4 倍, 对鲤上皮瘤细胞 (EPC) 的黏附能力显著降低, 下降了 66.6%, 而互补株的黏附能力和毒力又得到恢复, 与野生株无明显差异。研究首次确证了拟态弧菌 OmpU 蛋白具有黏附功能, OmpU 蛋白通过黏附参与致病作用。

关键词: 拟态弧菌; OmpU 蛋白; 缺失株; 黏附性; 毒力

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*, Vm) 是一种与霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的表型特性极为相似、遗传特征略有差异的人和水产动物共患病原菌^[1]。该菌不仅可引起水产养殖动物严重的腹水病, 而且可通过水产动物和水产品感染人类, 引起人类细菌性食物中毒^[2-4]。长期以来抗菌药物是控制水产养殖动物腹水病的一种重要手段, 但是随着抗菌药物的长期使用, 细菌不断产生耐药性, 使得抗菌治疗无明显效果, 导致患病动物大批死亡, 严重制约了水产养殖业的健康发展。因此, 寻找有效的防治腹水病的新方法具有重要意义。

细菌黏附是病原菌引发感染的关键起始步骤, 其实质是细菌黏附素与宿主受体之间的相互作用, 使病原菌选择性地定植于宿主细胞表面, 进而生长繁殖, 产生毒力因子或侵入深部, 损伤或破坏组织, 导致疾病的发生^[5]。从分子水平研究病原菌黏附素与宿主受体相互作用的分子基础, 明确药物作用靶点, 才能最直接、最有效地阻止病原菌侵入机体细胞, 这是当前细菌性疾病防治研究中的热点问题。目前人们已明确了致病性大肠杆

菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等一些重要病原菌的黏附素与其受体相互识别作用的结合域^[6-8]。新近, 国外学者^[9-11]又试图通过突变或修饰黏附素受体结合域、破坏黏附素蛋白的顺应力、使用纳米材料封闭受体蛋白等途径阻断或拮抗细菌对宿主细胞的黏附, 达到防治细菌性疾病的目的。

外膜蛋白 (outer membrane proteins, Omps) 是革兰氏阴性菌外膜的主要结构, 它们位于细菌细胞膜表面, 当病原菌入侵和感染宿主时, 在维持细菌形态、物质代谢、细菌黏附组织细胞和致病等方面发挥作用。目前已有文献报道 OmpU 蛋白是存在于河流弧菌 (*Vibrio fluvialis*)、拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 等多种病原弧菌中较为保守的功能蛋白^[12-13]。Sperandio 等^[14]和 Goo 等^[15]先后探明了 OmpU 蛋白是霍乱弧菌和创伤弧菌的黏附素, 具有黏附功能。在前期研究中发现拟态弧菌

收稿日期: 2014-01-22

修回日期: 2014-03-08

资助项目: 国家自然科学基金 (31272696); 安徽农业大学学位点建设项目 (XKXWD2013006)

通信作者: 李瑾年, E-mail: lijinnian2000@163.com

OmpU 蛋白 N 末端含有黏附素基序,重组 OmpU 蛋白具有免疫保护作用,抗重组 OmpU 蛋白抗体对拟态弧菌具有明显的黏附抑制作用,提示 OmpU 蛋白是拟态弧菌的黏附素^[16-17],但 OmpU 蛋白的黏附功能仍需确认,以排除 OmpU 蛋白特异性抗体的黏附抑制作用是抗原抗体反应造成的空间位阻效应。对此,本研究通过自杀性质粒介导的同源重组方法从拟态弧菌基因组中缺失 *OmpU* 基因,并构建其互补株。对野生株、缺失株和互补株的细胞黏附性和致病性等进行比较研究,确证拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能和介导的致病作用,从而为深入研究拟态弧菌的分子致病机理,以及研制黏附拮抗剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟态弧菌 04-14 菌株由本实验室从患腹水病病鱼中分离、鉴定并保存;质粒 pUC57 和

pBAD33 由本实验室保存;质粒 pKD3 和 *E. coli* S17-1 由上海兽医研究所兽医公共卫生研究室惠赠;自杀质粒 pWM91 购自中国质粒载体保藏中心;鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini,EPC)购自上海海洋大学农业部渔业动植物病原库;草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(50±5)g/尾购自安徽肥东县某渔场。API-ID32E 测试卡为法国梅里埃公司产品。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的拟态弧菌 Vm223 株(登录号 NZ_ADAJ01000006.1)的 *OmpU* 基因及其上、下游同源序列,质粒 pKD3 序列以及 pWM91 的多克隆位点,设计 4 对引物,其中引物 Cm-1 5'端前 11 bp 序列与 OmpU L-2 5'端前 11 bp 序列反向互补;Cm-2 3'端前 15 bp 序列与 OmpU R-1 5'端前 15 bp 序列呈反向互补,以便进行重叠延伸 PCR(SOE PCR)。引物序列和扩增基因片段大小见表 1。引物由上海生物工程公司合成。

表 1 本研究所用的引物序列
Tab.1 Sequence of primers in the study

基因 gene	引物 primer	序列(5'→3') sequence	酶切位点 restriction site	产物长度/bp product length
upstream of <i>OmpU</i>	OmpU L-1	CCGCTGAGAGCTTCGGCAATCGCTT	<i>Xho</i> I	672
	OmpU L-2	CTCCAGCCTACCTTATTAAGTCCTAA	/	
downstream of <i>OmpU</i>	OmpU R-1	CTAAGGAGGATATTCTGTTGACTTAACGTC	/	527
	OmpU R-2	ATTTGCGGCCGCCAGCCATAAATCACCATT	<i>Not</i> I	
<i>Cm^r</i>	Cm-1	GTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	/	1 012
	Cm-2	CATATGAATATCCTCCTTAG	/	
<i>OmpU</i>	OmpU-1	CGGGGTACCATGAACAAGACTCTGATTGC	<i>Kpn</i> I	1 072
	OmpU-2	TGCACTGCAGTTAGAAAGTCGTAACGTAGAC	<i>Pst</i> I	

注:划线部位为引入的酶切位点
Notes;the underlined nucleotides indicate creation of a restriction site

1.3 重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmp 的构建

用 OmpUL-1/OmpUL-2、OmpUR-1/OmpUR-2 两对引物从拟态弧菌 04-14 基因组分别 PCR 扩增 *OmpU* 基因的上、下游同源臂 OmpUL 和 OmpUR,同时以 pKD3 质粒为模版,用引物 Cm-1/Cm-2 扩增氯霉素抗性基因 *Cm^r*(图 1)。将纯化后的 *Cm^r* 和 OmpUR 片段按 1:1 混合作为模板,以 Cm-1/OmpUR-2 为引物,通过 SOE PCR 将 *Cm^r*、OmpUR 连接起来。SOE PCR 反应条件为 95℃预变性 4 min,94℃变性 1 min,48℃退火 30 s,72℃复性 1 min,5 个循环后,再以 94℃变性 1 min,48℃退火 30 s,72℃复性 1 min 扩增 30 个

循环,最后 72℃延伸 10 min。连接片段 OmpUR-*Cm^r*经纯化回收后再与 OmpUL 混合作为模板,用引物 OmpUL-1/OmpUR-2 进行 SOE PCR(条件同上),获得的 OmpUR-*Cm^r*-OmpUL 融合片段克隆至 pUC57 形成重组质粒 pUC57-OmpUL *Cm^r* OmpUR。测序正确后,用 *Xho* I/*Not* I 双酶切重组质粒和自杀质粒 pWM91。将酶切后的自杀质粒和融合片段按适当的比例混合,加入 *T₄* 连接酶连接过夜,再将连接产物热激法转化到 *E. coli* S17-1 感受态细胞中,构建一个 *Cm^r*基因两侧具有 OmpU 基因上、下游同源臂的重组自杀性质粒 pWM19-ΔOmp,并进行双酶切和测序鉴定。

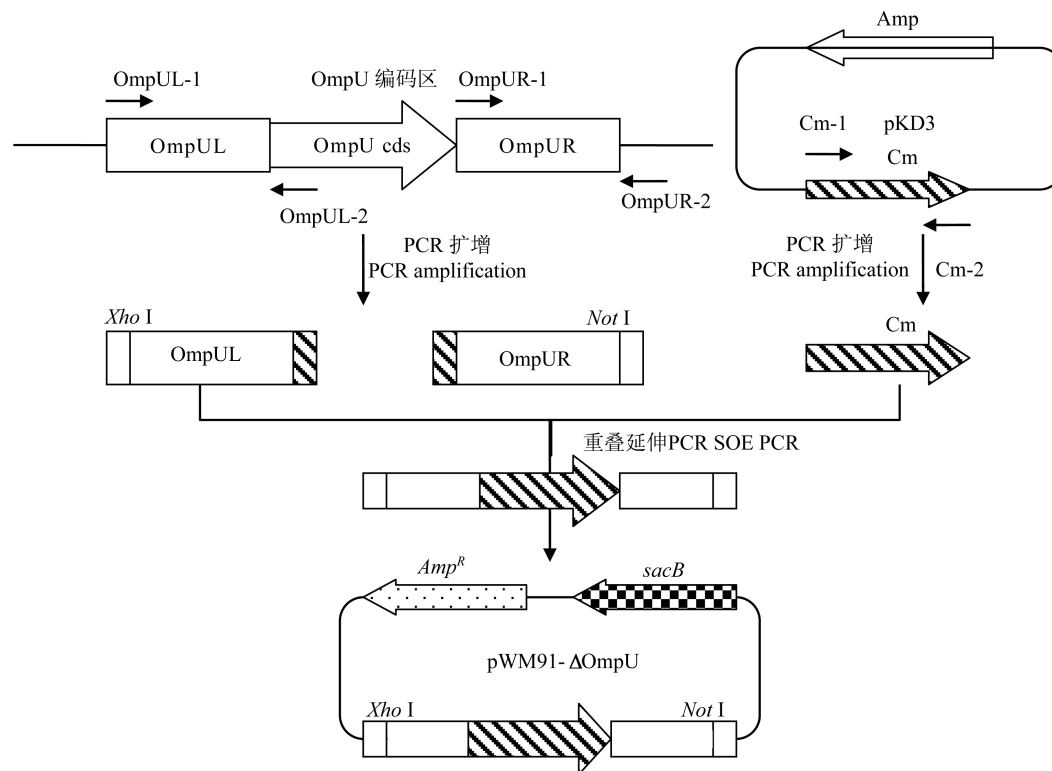


图1 重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmp 的构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of construction of plasmid pWM91-ΔOmp

1.4 *OmpU* 基因缺失株的构建与鉴定

以携带重组自杀质粒 pWM91-ΔOmp 的 *E. coli* S17-1 为供体菌,拟态弧菌 04-14 株为受体菌进行自杀性质粒的接合转移。分别将培养至对数生长期的受体菌与供体菌等体积混匀后滴加到铺于 LB 琼脂平板表面的无菌微孔滤膜上,30℃ 接合 4.5 h,同时做供体菌和受体菌对照。用 PBS 洗下滤膜上菌液,涂布双抗性 LB 琼脂平板(100 μg/mL Amp,10 μg/mL Cm),30℃ 培养 24 h,长出的菌落即为阳性接合子。二步法筛选基因缺失株的流程见图 2,即将阳性接合子接种含 10% 蔗糖无 NaCl 的 LB 琼脂平板,25℃ 培养 48 h,各挑取 30 个有蔗糖耐性菌落分别点种到 LB 琼脂平板和含 100 μg/mL Amp 的 LB 琼脂平板上,在 LB 平板上能生长而在含 Amp LB 平板上不能生长的菌株为可疑缺失突变株。

用引物对 OmpU-1/OmpU-2、Cm-1/Cm-2、OmpUL-1/Cm-2、Cm-1/OmpUR-2 对可疑缺失突变株进行组合 PCR 鉴定。同时,将用引物 OmpUL-1/OmpUR-2 扩增的 PCR 产物克隆于 pMD18-T 载体中进行测序验证。

1.5 互补株的构建

以拟态弧菌 04-14 株基因组 DNA 为模板,用引物 OmpU1/OmpU2 扩增 OmpU 基因全序列,用 *Kpn* I/*Pst* I 双酶切 PCR 产物及低拷贝质粒 pBAD33,将酶切产物用 T₄ DNA 连接酶连接并转化至 DH5αλpir 感受态细胞中,提取质粒进行序列分析,将测序正确的重组 pBAD33-OmpU 质粒电转至缺失株 04-14-ΔOmpU 中,通过 Amp 筛选,PCR 鉴定和测序鉴定回补质粒已存在缺失株中,从而获得携带 OmpU 基因的互补株 04-14-ΔOmpHB。

1.6 缺失株的遗传稳定性测定

将缺失株 04-14-ΔOmp 接种于 LB 琼脂培养基中连续盲传 25 代,挑取第 5、10、15、20、25 代单菌落,用引物 OmpU-1/OmpU-2 进行 PCR 扩增,以检测基因缺失株的遗传稳定性。

1.7 缺失株的生长特性和生化特性测定

在相同培养条件下,挑取野生株和缺失株的单菌落接种 BHI 培养液,30℃ 过夜培养后,按 1:100 转接到 BHI 培养液中,30℃ 振荡培养 20 h,每隔 1 h 测定菌液 OD₆₀₀ 值,重复实验 3 次并绘制

生长曲线。将野生株和缺失株分别接种于 BHI 琼脂培养基,置 28 ℃ 培养 24 h,观察细菌的形态和培养特性。此外,将野生株和缺失株配成

0.5 McFarland 的菌悬液,接种 API-ID32E 测试卡,置 28 ℃ 培养 24 h,观察其生化特性。

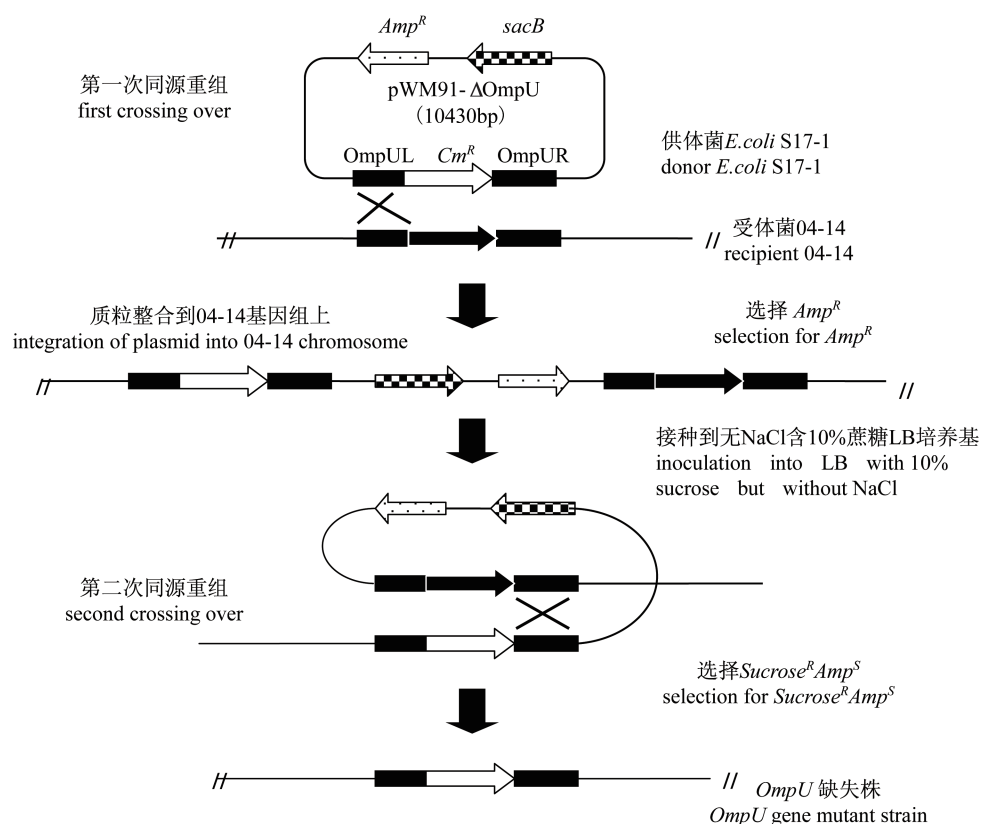


图 2 缺失突变株的筛选示意图

Fig. 2 Schematic diagram of screening of the $\Delta OmpU$ mutant

1.8 缺失株的细胞黏附性测定

EPC 用含 10% 胎牛血清的 M199 培养液,在 28 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,将生长状态良好的上皮细胞 (2×10^5 个/mL) 接种于 24 孔细胞培养板(一半孔中预先加有盖玻片),待细胞长满至单层的 80% 时,用无菌 PBS 洗 2 遍,分别加入 500 μ L 浓度为 2×10^7 cfu/mL 的野生株、缺失株和互补株菌液(各设置 6 个平行孔),室温孵育 60 min,弃菌液,用无菌 PBS 洗 3 遍以去除未黏附的细菌。一份(含 3 个平行孔)经甲醇/冰乙酸固定后结晶紫染色、水洗、封片,油镜下随机计数 30 个细胞表面的黏附菌数。另一份(含 3 个平行孔)经含 1% TritonX-100 的胰酶裂解细胞后,取细胞裂解液做 10 倍连续稀释,分别取 100 μ L 平行涂布 2 块营养琼脂平板,30 ℃ 培养 24 h 后计数菌落数,计算细菌黏附数(细菌黏附数 = 菌落平均数 $\times$ 稀释倍数)。采用 Student's *t* 检验分析野生

株、缺失株和互补株对 EPC 细胞黏附的差别。

1.9 缺失株对草鱼的毒力测定

实验草鱼在仿生态式循环水系统[水温为 (25 ± 1) ℃,空气湿度为 50% ~ 60%]暂养 10 d 后用于实验。实验鱼随机分成 16 组,11 尾/组,1 ~ 5 组腹腔注射野生株菌液,剂量分别为 1.92×10^6 、 7.68×10^5 、 3.06×10^5 、 1.22×10^5 、 4.88×10^4 cfu/尾;6 ~ 10 组腹腔注射缺失株菌液,剂量分别为 11.25×10^6 、 7.5×10^6 、 6×10^6 、 4×10^6 、 2.67×10^6 cfu/尾;11 ~ 15 组腹腔注射互补株菌液,剂量同野生株;第 16 组为阴性对照,注射无菌 PBS。注射后各组鱼转移至不同的鱼缸饲养,并将水温控制在 (28 ± 1) ℃,观察记录 14 d 内实验鱼的发病和死亡情况,死亡鱼内脏接种营养琼脂培养基再次分离细菌,并根据 Reed-Muench 法^[18]计算突变株、野生株和互补株的半数致死量 (LD_{50})。

2 结果

2.1 重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmpU 的鉴定

经 *Xho* I/*Not* I 双酶切后,获得大小约为 8 261和 2 179 bp 2 条 DNA 条带(图 3),分别与 pWM91 和融合片段(*OmpUR*-Cm^r-*OmpUL*)的大小一致。DNA 测序结果亦显示 3 个 DNA 片段序列和连接顺序完全正确,说明重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmp 构建成功。

2.2 缺失株 04-14-ΔOmp 的筛选与验证

重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmp 经转化、接合转移至拟态弧菌 04-14 菌株,通过抗生素筛选和蔗糖反向筛选获得的单菌落为疑似缺失株。分别以疑似缺失株、野生株和互补株的基因组 DNA 为模板,用引物对 *OmpU*-1/*OmpU*-2、Cm-1/Cm-2、*OmpUL*-1/Cm-2、Cm-1/*OmpUR*-2 进行组合 PCR 鉴定。分别扩增出大小为 1 072、1 013、1 674 和 1 525 bp 的 DNA 片段,与预期结果相符。测序结果亦证明 *OmpU* 基因缺失株和互补株构建

成功(图 4)。

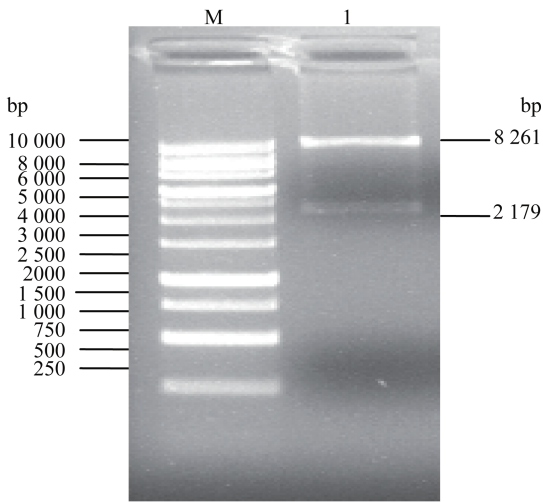


图 3 重组自杀性质粒 pWM91-ΔOmp 的酶切鉴定
M. DNA 分子量标准; 1. 双酶切产物

Fig. 3 Enzyme digestion of recombinant plasmid pWM91-ΔOmp

M. DNA molecular size marker of 250 to 10 000 bp; 1. pWM91-ΔOmp digested with *Xho* I and *Not* I

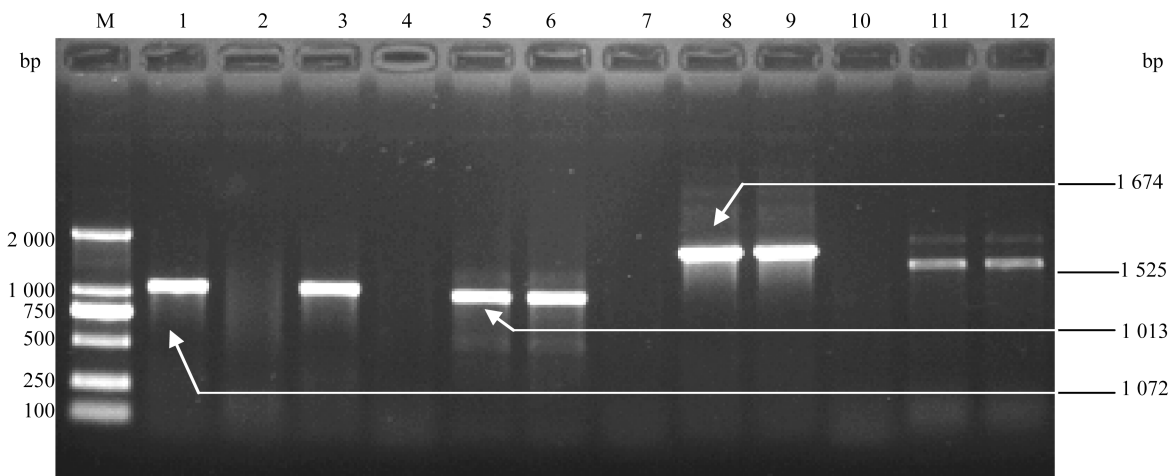


图 4 *OmpU* 基因缺失株和互补株的组合 PCR 验证结果

M. DL2000; 1~3. *OmpU*-1/*OmpU*-2 PCR 产物; 4~6. Cm-1/Cm-2 PCR 产物; 7~9. *OmpUL*-1/Cm-2 PCR 产物; 10~12. Cm-1/*OmpUR*-2 PCR 产物,其中 1、4、7、10 为野生株扩增条带,2、5、8、11 为缺失突变株扩增条带,3、6、9、12 为互补株扩增条带

Fig. 4 Multiple-PCR confirmation of *OmpU* gene deletion mutant and complemented strains

M. DL2000; 1~3. *OmpU*-1/*OmpU*-2 PCR amplification of wild strain, deletion mutant strain and complemented strain, respectively; 4~6. Cm-1/Cm-2 PCR amplification of wild strain, deletion mutant strain and complemented strain, respectively; 7~9. *OmpUL*-1/Cm-2 PCR amplification of wild strain, deletion mutant strain and complemented strain, respectively; 10~12. Cm-1/*OmpUR*-2 PCR amplification of wild strain, deletion mutant strain and complemented strain, respectively

2.3 缺失株的遗传稳定性

缺失株 04-14-ΔOmp 在 LB 琼脂培养基

中连续盲传 5、10、15、20 和 25 代的单菌落,用引物 *OmpU*-1/*OmpU*-2 进行 PCR 扩增,结果发

现,每一代均未扩增出大小为 1 072 bp 的 *OmpU* 目的基因(图 5),而从野生株 04-14 基因组中可扩增到目的基因,说明缺失株稳定遗传。

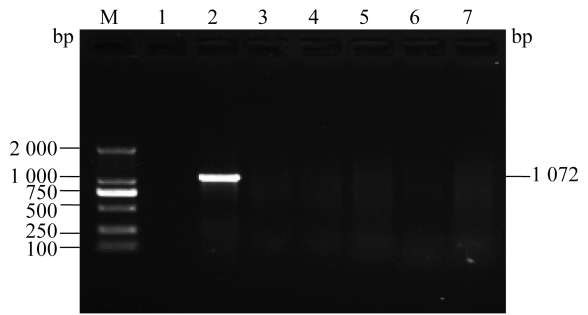


图 5 PCR 鉴定缺失株的遗传稳定性

M. DL2000; 1. 阴性对照; 2. 野生株扩增结果; 3~7. 第 5、10、15、20 和 25 代缺失株扩增结果

Fig. 5 Genetic stability of the mutant strain 04-14-Δ*OmpU* identified by PCR

M. DL2000; 1. negative control; 2. PCR amplification of wild strain 04-14; 3-7. PCR amplification of the 5th, 10th, 15th, 20th and 25th generation of 04-14-Δ*OmpU* mutant

2.4 缺失株的生长特性和生化特性

0~3 h 野生株和缺失株的生长速率基本一致;4~10 h 缺失株生长速率略小于野生株;缺失株和野生株分别在培养 11 和 16 h 后达到稳定期,稳定期内缺失株的细菌密度值(平均 OD₆₀₀ 为 1.3)较野生株低(平均 OD₆₀₀ 为 1.9),两者间差异极显著($P < 0.01$)(图 6)。野生株和缺失株在 BHI 琼脂平板上均形成无色、圆形、半透明、边缘整齐、表面湿润、略隆起的菌落,只是缺失株的菌落直径略小些;革兰氏染色显示均为 G⁻ 弧菌。生化特性方面几乎没有变化,缺失株仅丧失了分解麦芽糖的能力(表 2)。

2.5 缺失株的黏附性

在相同的培养条件下,比较野生株、突变株和互补株对 EPC 细胞的黏附能力。结果发现它们均有黏附作用,平均每个细胞黏附细菌数分别为 32.3 ± 4.5 、 10.8 ± 0.5 和 31.3 ± 2.8 个,PBS 空白对照组的细胞形态完好,无细菌黏附(图 7-A)。由图 7-B 可见,以野生型菌株对 EPC 细胞的黏附能力作为参照,*OmpU* 基因缺失株黏附细胞的能力显著下降了 66.6% ($P < 0.01$),而互补株的黏附能力又恢复到野生株的 98%,说明 *OmpU* 蛋白是拟态弧菌的黏附素。

表 2 缺失株与野生株的生化特性

Tab. 2 Biochemical characteristics of wild strain and mutant strain

特性 character	野生株 wild strain	缺失株 mutant strain
鸟氨酸脱羧酶 ODC	+	+
精氨酸双水解酶 ADH	-	-
赖氨酸脱羧酶 LDC	-	-
尿素酶 URE	-	-
阿拉伯糖醇 LARL	-	-
半乳糖酸盐 GAT	-	-
5-酮基葡萄糖酸钠 5KG	-	-
脂肪酸 LIP	-	-
酚红 RP	+	+
β-葡萄糖苷酶 β-GLU	-	-
甘露醇 MAN	-	-
麦芽糖 MAL	+	-
侧金盏花醇 ADO	-	-
异麦芽酮糖 PLE	-	-
β-葡萄糖酸酶 β-GUR	-	-
丙二酸盐利用 MNT	-	-
吡啶产生 IND	+	+
N-乙酰-β-葡萄糖苷酶 β-NAG	-	-
β-半乳糖苷酶 β-GAL	+	+
葡萄糖 GLU	+	+
蔗糖 SAC	-	-
L-阿拉伯糖 LARA	-	-
D-阿拉伯糖 DARA	-	-
α-葡萄糖 Aglu	-	-
α-半乳糖苷酶 αGAL	-	-
海藻糖 TRE	-	-
鼠李糖 RHA	-	-
肌醇 INO	-	-
纤维二糖 CEL	-	-
山梨醇 SOR	-	-
α-麦芽糖苷酶 αMAL	-	-
L-天门冬素芳胺酶 ASPA	-	-

注:“+”代表阳性;“-”代表阴性

Notes: “+”, positive; “-”, negative

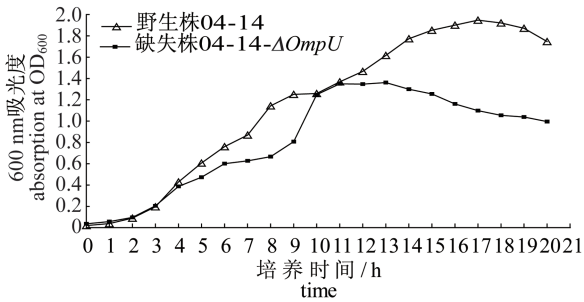


图 6 野生株和缺失株的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of *V. mimicus* strain 04-14 and the Δ*OmpU* mutant

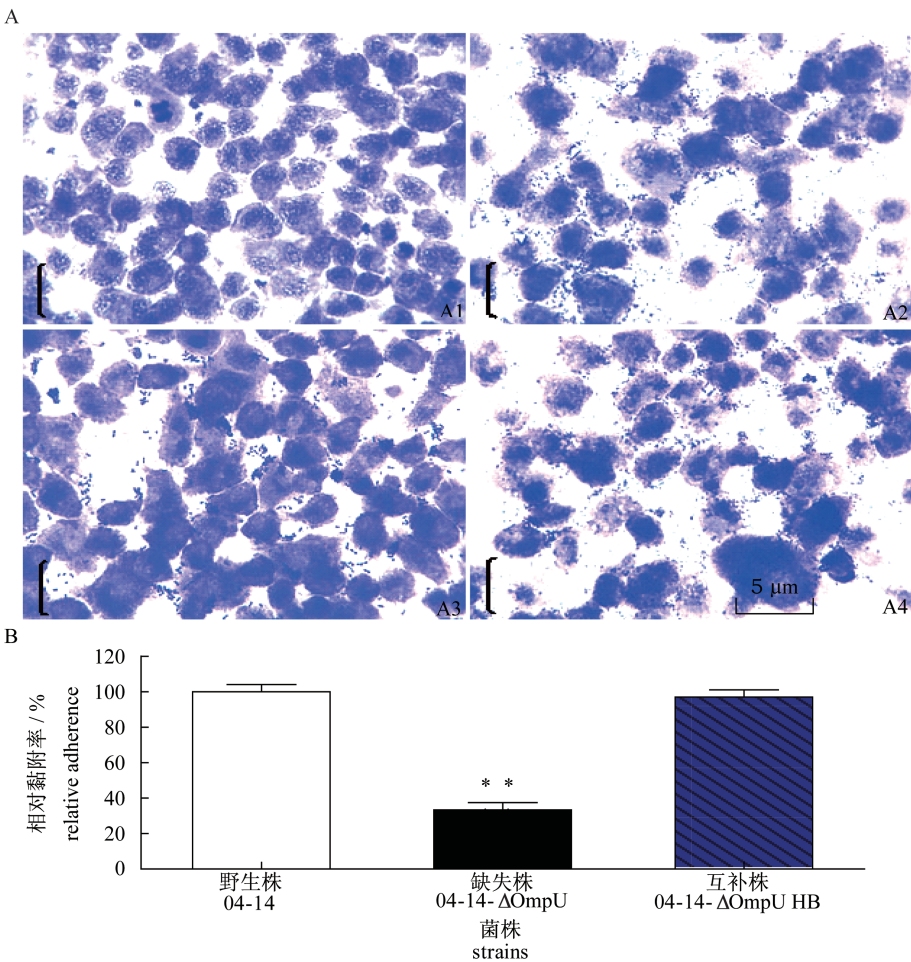


图 7 野生株、缺失株和互补株对 EPC 细胞的黏附

A1. EPC 细胞对照; A2. 野生株对 EPC 细胞的黏附; A3. 缺失株对 EPC 细胞的黏附; A4. 互补株对 EPC 细胞的黏附; B. 缺失株、互补株的相对黏附率
** 示与其他组相比差异极显著

Fig. 7 Adhesion to EPC cell of *V. mimicus* strain 04-14, $\Delta OmpU$ mutant and complemented strain

A1. EPC cells control; A2. adhesion to EPC cells of the wild strain; A3. adhesion to EPC cells of the $\Delta OmpU$ mutant; A4. adhesion to EPC cells of the complemented strain; B. relative adhesion rate of the $\Delta OmpU$ mutant and complemented strain
** $P < 0.01$ vs other groups

2.6 缺失株的毒力

经 Reed-Muench 法计算,获得野生株、缺失株和互补株的 LD₅₀ 分别为 1.07 × 10⁶、4.43 × 10⁶ 和 1.23 × 10⁶ CFU/mL,与野生株毒力比较,缺失突变株的毒力降低了 4 倍,而野生株和互补株的毒力差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

3 讨论

基因敲除技术主要是运用 DNA 同源重组原理,用设计的同源片段替代靶基因片段,从而达到基因敲除的目的^[19]。目前该技术已经广泛应用于生命科学研究的各个领域,尤其是病原菌功能

基因组学的研究^[20]。本研究为探明拟态弧菌 OmpU 蛋白的黏附功能和是否参与致病作用,利用基因敲除技术,通过构建一个 *Cm^r* 基因两侧具有与 OmpU 基因上下游同源序列同源的重组自杀质粒 pWM91- ΔOmp ,进而在自杀质粒和拟态弧菌基因组 DNA 之间进行双向同源重组获得 *OmpU* 基因缺失株,同时构建了基因互补株。研究中选用的重组自杀质粒 pWM91- ΔOmp 含有正向选择的氯霉素抗性基因和反向选择的蔗糖敏感基因 (*sacB*) 2 种选择标记, *sacB* 基因编码果聚糖蔗糖酶,能催化蔗糖水解成果聚糖,后者对许多革兰氏阴性菌来说是一种致死性的有毒化合物。因

此,用 Cm 抗性的蔗糖培养基筛选缺失株,只有经过二次同源重组 Cm 基因替换了目的基因, pWM91 载体脱落的菌株才能在 Cm 抗性的蔗糖培养基中生长,从而明显提高了筛选效率。

表 3 不同菌株对草鱼的 LD₅₀测定
Tab.3 LD₅₀determinations of different strains to grass carp

菌株 strain	攻毒剂量/ CFU dosage	死亡数 no. of death	存活数 no. of living	累计结果 cumulative results				半数致死量/ (CFU/mL) LD ₅₀
				存活 living	死亡 death	死亡比例 proportion of death	死亡率/% mortality	
野生株 wild strain 04-14	1.92 × 10 ⁶	10	1	1	13	13/14	92.86	1.07 × 10 ⁶
	7.68 × 10 ⁵	3	8	9	3	3/12	25	
	3.06 × 10 ⁵	0	11	20	0	0/20	0	
	1.22 × 10 ⁵	0	11	31	0	0/31	0	
	4.88 × 10 ⁴	0	11	42	0	0/42	0	
缺失株 04-14-ΔOmp	11.25 × 10 ⁶	11	0	0	33	33/33	100	4.43 × 10 ⁶
	7.5 × 10 ⁶	10	1	1	22	22/23	95.65	
	6 × 10 ⁶	7	4	5	12	12/17	70.59	
	4 × 10 ⁶	5	6	11	5	5/16	31.25	
	2.67 × 10 ⁶	0	11	22	0	0/22	0	
互补株 04-14-ΔOmpHB	1.92 × 10 ⁶	8	3	3	11	11/14	78.57	1.23 × 10 ⁶
	7.68 × 10 ⁵	2	9	12	3	3/15	20	
	3.06 × 10 ⁵	1	10	22	1	1/23	4.35	
	1.22 × 10 ⁵	0	11	33	0	0/33	0	
	4.88 × 10 ⁴	0	11	44	0	0/44	0	

尽管已有研究发现,拟态弧菌 OmpU 蛋白 N 末端含有黏附素基序,重组 OmpU 蛋白抗体具有明显的黏附抑制作用^[16-17],但 OmpU 蛋白的黏附功能仍需确认。EPC 细胞来源于鲤乳头状上皮瘤细胞,具有贴壁生长,培养简单,生长快速等优点,是水生动植物病毒分离和鉴定中的常用细胞系^[21-22]。一些研究报道认为 EPC 细胞也是研究鱼类病原菌黏附和侵袭特性的理想细胞模型^[23-27]。考虑到拟态弧菌 04-14 菌株是从患腹水病病鱼体内分离获得,故本研究以 EPC 细胞作为体外细胞黏附模型,比较野生株、缺失株和互补株对 EPC 细胞的黏附能力。结果发现,与野生株相比,OmpU 基因缺失株对 EPC 细胞的黏附能力显著下降了 66.6%,而互补株的黏附能力又得到恢复,从而在基因水平上首次确证了 OmpU 蛋白是拟态弧菌的一种重要黏附素。分析缺失株黏附力降低的原因可能是 OmpU 基因的缺失改变了菌体表面结构,细胞壁的完整性被破坏,最终影响了细菌的正常黏附功能。研究中同时发现 OmpU 基因缺失株没有完全丧失对 EPC 细胞的黏附力,提示拟态弧菌的黏附除了由 OmpU 蛋白介导外,可能还有其他黏附素(如菌毛)的参与。

李玉英等^[28]报道拟态弧菌的致病性取决于多种毒力因子,如黏附素、肠毒素、溶血素等,但通

过黏附素黏附易感组织细胞是造成感染的关键第一步,病原菌的黏附力降低,其毒力随之降低。本实验结果也说明了这一点,即与野生株相比,OmpU 基因缺失株对实验草鱼的毒力降低了 4 倍,OmpU 蛋白黏附素参与拟态弧菌的致病作用。

参考文献:

[1] Wang D C, Wang H Y, Zhou Y Y, et al. Genome sequencing reveals unique mutations in characteristic metabolic pathways and the transfer of virulence genes between *V. mimicus* and *V. cholerae*[J]. PLoS One,2011,6(6):e21299.

[2] Chitov T, Kirikaew P, Yungyune P, et al. An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus* [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2009, 28(4): 421-424.

[3] Wang G L, Zheng T L, 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. [王国良,郑天伦,金珊,等.黑鲟幼鱼腹水病病原菌.中国兽医学报,2003,23(1):33-35.]

[4] Li J N, Li Y Y, Hu S K, et al. Analysis on pathogen producing ascitic fluid disease of *Eriocheir sinensis*

- [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12 (3): 267 – 274. [李瑾年, 李玉英, 胡守奎, 等. 中华绒螯蟹腹水病病原分析. 中国水产科学, 2005, 12 (3): 267 – 274.]
- [5] Klemm P, Vejborg R M, Hancock V, *et al.* Prevention of bacterial adhesion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88 (2): 451 – 459.
- [6] Farfan M J, Torres A G. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains [J]. Infection and Immunity, 2012, 80 (3): 903 – 913.
- [7] Kisiela D I, Kramer J J, Tchesnokova V, *et al.* Allosteric catch bond properties of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286 (44): 38136 – 38147.
- [8] Nowrouzian F L, Dauwalder O, Meugnier H, *et al.* Adhesin and superantigen genes and the capacity of *Staphylococcus aureus* to colonize the infantile gut [J]. Journal of Infectious Diseases, 2011, 204 (5): 714 – 721.
- [9] Zakeri B, Fierer J O, Celik E, *et al.* Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109 (12): 690 – 697.
- [10] Klinth J E, Pinkner J S, Hultgren S J, *et al.* Impairment of the biomechanical compliance of P pili: a novel means of inhibiting uropathogenic bacterial infections? [J]. European Biophysics Journal, 2012, 41 (3): 285 – 295.
- [11] Anselme K, Davidson P, Popa A M, *et al.* The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale [J]. Acta Biomaterialia, 2010, 6 (10): 3824 – 3846.
- [12] Lin H Y, Ma Z N, Zheng Y Q. Screening and cross-immunogenicity of broad-spectrum outer membrane protein from *Vibrio* [J]. Journal of Fuzhou University: Natural Science Edition, 2012, 40 (4): 535 – 540. [林海英, 马振宁, 郑允权. 弧菌广谱性外膜蛋白抗原筛选及其单抗的交叉免疫原性研究. 福州大学学报: 自然科学版, 2012, 40 (4): 535 – 540.]
- [13] Qi L F, Liu X Q, Zhang T T, *et al.* Cloning, sequencing and bioinformatics analysis of OmpU gene from *Vibrio fluvialis* strains isolated from aquatic products [J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25 (6): 630 – 635. [戚莉芳, 刘雪芹, 张婷婷, 等. 水产品中河流弧菌分离株 OmpU 基因的克隆测序与生物信息学分析. 中国微生态学杂志 2013, 25 (6): 630 – 635.]
- [14] Sperandio V, Giron J A, Silveira W D, *et al.* The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae* [J]. Infection and Immunity, 1995, 63 (11): 4433 – 4438.
- [15] Goo S Y, Lee H J, Kim W H, *et al.* Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis [J]. Infection and Immunity, 2006, 74 (10): 5586 – 5594.
- [16] Li X F. The outer membrane protein gene sequence of *Vibrio mimicus* and bioinformatics analysis [J]. Reservoir Fisheries, 2007, 27 (3): 13 – 16. [李小飞, 李瑾年, 余为一, 等. 拟态弧菌安徽分离株外膜蛋白基因 OmpU 的克隆测序与生物信息学分析. 水利渔业, 2007, 27 (3): 13 – 16.]
- [17] Li X F, Li J N, Ji J J, *et al.* Prokaryotic expression of outer membrane protein U gene of *Vibrio mimicus* and its immunoprotection [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 307 – 312. [李小飞, 李瑾年, 季晶晶, 等. 拟态弧菌外膜蛋白 OmpU 基因的原核表达及其免疫保护性研究. 中国水产科学, 2008, 15 (2): 307 – 312.]
- [18] Thakur A K, Fezio W L. A computer program for estimating LD₅₀ and its confidence limits using modified Behrens-Reed-Muench cumulant method [J]. Drug and Chemical Toxicology, 1981, 4 (3): 297 – 305.
- [19] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination [J]. Science, 1989, 244 (4910): 1288 – 1292.
- [20] Wang F, Zhao J L, He X, *et al.* Construction and function analysis of the *ipaH4. 5* gene deletion mutant of *Shigella flexneri* 2a strain 301 [J]. Microbiology China, 2010, 37 (5): 714 – 720. [王芳, 赵江丽, 何湘, 等. 志贺氏菌福氏 2a 301 株 *ipaH4. 5* 突变株的构建及生物学功能分析. 微生物学通报, 2010, 37 (5): 714 – 720.]
- [21] Lorenzen E, Carstensen B, Olesen N J. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 37 (2): 81 – 88.
- [22] Balseiro A, Dalton K P, del Cerro A, *et al.* Pathology, isolation and molecular characterization of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes*

- obstetricans on the Iberian Peninsula[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 84(2): 95 – 104.
- [23] Ling S H, Wang X H, Xie L, *et al.* Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models[J]. Microbiology, 2000, 146(1): 7 – 19.
- [24] Ormonde P, Hörstedt P, O'Toole R, *et al.* Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum* [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(8): 2326 – 2328.
- [25] Santos Y, Bandi N I, Nieto T P, *et al.* Cell-surface-associated properties of fish pathogenic bacteria[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1991, 3(4): 297 – 301.
- [26] Gu T Z, Lu C P, Chen H Q. Adhesion of acinetobacter baumannii strain MF1 isolated from mandarin fish [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1999, 22(3): 65 – 68. [顾天钊, 陆承平, 陈怀青. 鲍氏不动杆菌 MF1 株的粘附特性. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 65 – 68.]
- [27] Zhu X G, Fan H J, Lu C P, *et al.* The adhesins of *Aeromonas hydrophila* J-1 and their receptors [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2002, 25(2): 82 – 84. [朱兴国, 范红结, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌 J-1 株粘附素及其受体分析. 南京农业大学学报, 2002, 25(2): 82 – 84.]
- [28] Li Y Y, Li J N, Yu W Y. Research progress in molecular biology of virulence factors of *Vibrio mimicus* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(2): 22 – 24. [李玉英, 李瑾年, 余为一. 拟态弧菌毒力因子的分子生物学研究进展. 动物医学进展, 2003, 24(2): 22 – 24.]

Adhesion function of OmpU protein from *Vibrio mimicus* and its role in virulence

WANG Wei, HU Dandan, LI Jinnian*, LIU Xueqin

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

Abstract: *Vibrio mimicus* is the causative agent of ascites disease in aquatic animals. It was found that there was an adhesion motif at amino-terminal of OmpU protein, and OmpU-specific antibody exhibited significant inhibition effects on the adhesion of *V. mimicus* to cells in our previous studies, but adhesion function of OmpU protein is still unclear. To investigate the role of OmpU protein from *V. mimicus* in cell adhesion and virulence, the *OmpU* gene deletion mutant of *V. mimicus* 04 – 14 strain was constructed by the homologous recombination. A recovery mutant was obtained by introducing a low-copy plasmid strain. PCR and sequence analysis confirmed that *OmpU* gene was successfully deleted in the mutant and restored in the complementary strain. We compared the differences of genetic stability, growth and biochemical characteristics, adhesion ability and virulence between the gene deletion mutant and wild strains, as well as the complemented strain. The results showed that the mutant strain stabilized genetically and grew slower than the wild strain. There was no significant difference between them in morphology, culture and biochemical characteristics. Compared with wild strain, deletion of *OmpU* gene significantly reduced bacterial adhesion to EPC cells monolayers by 66.6%, but the adhesion ability was restored in the complementary strain. Furthermore, the 50% lethal doses (LD_{50}) of the mutant strain was four times lower than those of the wild strain and complementary strain. These data indicate that the OmpU protein is involved in both adhesion and virulence in *V. mimicus*. The adhesion function of OmpU protein from *V. mimicus* and its role in virulence were confirmed for the first time.

Key words: *Vibrio mimicus*; OmpU protein; deletion mutant; adhesion; virulence

Corresponding author: LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com