

拟态弧菌溶血素 VMH 蛋白 B 细胞线性表位的预测与鉴定

曹 际, 陶会竹, 赵雨婷, 肖 宁, 李 瑾年*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: 为了定位拟态弧菌热不稳定溶血素 VMH 蛋白的 B 细胞线性表位, 以 VMH 蛋白全长氨基酸序列为基础, 联合利用 ABCpred 和 BepiPred 网络服务器综合分析预测 VMH 蛋白 B 细胞线性表位。同时, 以霍乱弧菌 Cytolysin 蛋白为同源建模模板, 利用 Modeller 9.14 软件构建 VMH 蛋白的 3D 结构, 并使用 PyMol 软件展示预测表位, 确定其在 3D 结构中的位置。共预测出 6 个最有可能的 B 细胞线性表位, 它们分别位于 VMH 蛋白 N 端 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₂₈₁₋₂₉₂、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 区域, 且完全或大部分暴露于蛋白 3D 结构表面。人工合成 6 条预测表位肽, 分别采用肽 ELISA、肽抑制性免疫印迹反应和溶血活性试验进行鉴定。结果发现 6 个预测表位肽均能与兔抗 VMH 蛋白抗体发生结合反应; 除预测表位 P₂₈₁₋₂₉₂ 外, 其余 5 个预测表位肽能明显抑制兔抗 VMH 蛋白抗体与 VMH 蛋白间的免疫印迹反应, 且具有溶血活性。结果表明, 预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 是拟态弧菌 VMH 蛋白的真正 B 细胞线性表位。

关键词: 拟态弧菌; VMH 蛋白; B 细胞线性表位; 免疫反应性; 溶血活性

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)02-0208-06

Prediction and identification of linear B-cell epitopes of *Vibrio mimicus* hemolysin VMH protein

CAO Ji, TAO Huizhu, ZHAO Yuting, XIAO Ning, LI Jinnian

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to locate the B-cell linear epitopes of *Vibrio mimicus* heat-labile hemolysin protein (VMH), B-cell linear epitope prediction was performed with comprehensive ABCpred and BepiPred web servers according to the full-length amino acid sequence of the protein. Meanwhile, taking cytolysin protein from *Vibrio.cholerae* as a template, a 3D structure model of VMH protein was constructed using Modeller 9.14 software, and the potential B-cell epitopes were represented for determination of their position in the 3D structure using PyMol software. The results showed that the six most likely epitopes, which were located in N-terminal regions of P₁₃₀₋₁₄₁, P₁₉₂₋₂₀₃, P₂₃₆₋₂₄₇, P₂₈₁₋₂₉₂, P₄₂₅₋₄₃₆, P₄₆₄₋₄₇₅, respectively and entirely or mostly exposed on the surface of the 3D structure model of VMH protein, were obtained after consideration of multiple factors. The six predicted epitope peptides were artificially synthesized and identified by peptide ELISA, inhibitory Western blotting and hemolytic activity assay. It was found that the six predicted epitope peptides could react to the rabbit anti-VMH protein antibody. Except predicted epitope P₂₈₁₋₂₉₂, other five predicted epitopes could significantly inhibit the immunoreaction between anti-VMH antibody and VMH protein in Western blotting and have hemolysis activity. These results indicated that predicted epitope P₁₃₀₋₁₄₁, P₁₉₂₋₂₀₃, P₂₃₆₋₂₄₇, P₄₂₅₋₄₃₆ and P₄₆₄₋₄₇₅ were indeed the linear B-cell epitopes of VMH protein from *V. mimicus*.

Key words: *Vibrio mimicus*; VMH protein; linear B cell epitope; immunoreactivity; hemolysis activity

拟态弧菌(*Vibrio mimicus*) 是一种严重危害水产养殖业的肠道病原菌。该菌可引起多种水生动物, 尤其是鱼类的腹水病^[1-2]。目前控制鱼类腹水病的手

段仍以内服抗菌药物和外用化学消毒剂为主, 但是由于抗生素的频繁使用, 诱导细菌产生耐药性, 使得抗菌治疗无明显效果, 导致患病鱼类大批死亡。

收稿日期: 2016-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(31672698)资助。

作者简介: 曹 际, 硕士研究生。E-mail: 2668564210@qq.com

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

因此, 亟需选择合适的疫苗靶点研发新型、高效的拟态弧菌疫苗, 用于鱼类腹水病的防治。

同其他胞外菌的致病过程一样, 拟态弧菌首先通过黏附素黏附定植于肠黏膜表面, 然后大量生长繁殖产生外毒素损害组织器官, 导致疾病发生。拟态弧菌热不稳定性溶血素 (*Vmimicus hemolysin*, VMH) 是几乎所有拟态弧菌分离株均能产生的外毒素^[3]。诸多研究表明 VMH 蛋白一方面可分别通过破坏红细胞膜和激活肠黏膜上皮细胞内腺苷环化酶而呈现较强的溶血性和肠毒性^[4-6], 另一方面它也是一种高度保守的免疫保护性抗原, 诱导机体产生的抗溶血素抗体可抵抗拟态弧菌感染^[7]。因此, VMH 蛋白是理想的疫苗靶抗原之一, 可以用其表位作为疫苗靶点, 研制特异、高效的多表位疫苗, 但其表位尚不明确。

利用生物信息学软件对蛋白抗原表位进行预测是一种快速筛选表位的方法, 不仅可节约大量的试验工作量, 避免传统表位研究的盲目性, 而且可快速发现一些新的表位。目前已报道的 B 细胞线性表位预测方法较多, 除传统的单一参数预测法外, ABCpred、BepiPred 及 BcePred 等多参数综合预测方法也已发展成熟, 并广泛应用于禽流感病毒、口蹄疫病毒及猪链球菌等许多病原微生物的抗原表位研究^[8-13]。尽管多参数综合预测法可使表位预测的准确性得到提升, 但仍需要通过生物试验加以验证。作者在前期研究工作中已制备了重组融合蛋白 His-VMH 及其多克隆抗体^[9], 本研究联合使用 ABCpred 法和 BepiPred 法预测拟态弧菌 VMH 蛋白 B 细胞线性表位并将其展示在 VMH 蛋白三维结构中, 确定其位置^[14-15]。在此基础上, 采用肽 ELISA、肽抑制性免疫印迹反应和溶血试验对预测表位肽进行鉴定, 以确定 VMH 蛋白的 B 细胞线性表位, 旨在为研发拟态弧菌多表位疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

纯化的重组融合蛋白 His-VMH 及其多克隆抗体由安徽农业大学动物科技学院实验室制备并保存^[9]; HRP 标记羊抗兔 IgG 和兔抗 His 标签蛋白抗体为 Pharmacia 公司产品; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 和预染蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 拟态弧菌 VMH 蛋白的 B 细胞线性表位预测

对 GenBank 中收录的 4 个拟态弧菌 VMH 蛋白全序列 (Accession No.EF187438、U68271.1、

ACYV01000003.1 和 ACYU01000041.1) 进行比对, 发现各序列间氨基酸同源性介于 98.7%~99.6%之间, 仅存在个别氨基酸差异。因此, 选取拟态弧菌标准株 ATCC33653 的 VMH 蛋白氨基酸序列 (No.U68271.1) 为分析材料, 联合运用 ABCpred 网络服务器 (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) 和 BepiPred 网络服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 预测该蛋白的 B 细胞线性表位, 其中 ABCpred 法的阈值参数设定为 0.51, 线性肽长度设定为 12 个氨基酸; BepiPred 法的阈值参数设定为 0.35。选择分值 >0.6, 2 种方法预测的共有序列作为潜在的 VMH 蛋白 B 细胞线性表位, 且预测表位肽长度以 ABCpred 法所预测的 12 肽为标准。

1.3 VMH 蛋白三维结构建模与预测表位展示

利用 Blastp 软件在 PDB 数据库搜索拟态弧菌 VMH 蛋白的同源蛋白。选择序列相似性为 85% 的霍乱弧菌 Cytolysin (HlyA) Pro-Toxin 蛋白作为同源模板, 使用 Modeller9.14 同源建模软件构建 VMH 蛋白的三维结构 (3D 结构)。3D 结构模型优化后, 再利用 PyMol 软件展示 VMH 蛋白的 3D 结构模型, 并将预测表位在蛋白 3D 结构中的相对位置 (表面或内部) 用不同颜色标记出来。

1.4 VMH 蛋白预测表位的鉴定

1.4.1 预测表位的人工合成 委托上海淘普生物科技有限公司采用固相合成法合成 6 个预测表位肽和 1 个无关对照肽 (MPKLNRCIAAIL, 为 VMH 蛋白的信号肽序列), 要求合成肽的纯度达到 98%。

1.4.2 预测表位的肽 ELISA 鉴定 预试验中通过方阵滴定法确定了预测表位肽的最佳包被浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 一抗 (兔抗 His-VMH 纯化抗体) 的最佳稀释度为 1:800。以上述质量浓度的预测表位肽和无关对照肽分别包被酶标板, 4°C 过夜。次日, 弃包被液, 加入 5%BSA, 37°C 封闭 2 h。弃封闭液, 用 0.5%PBST 洗涤 6 次后加入 1:800 倍稀释的兔抗 His-VMH 纯化抗体, 同时做兔阴性血清对照以及兔抗 His 标签蛋白抗体对照, 37°C 反应 1 h。0.5% PBST 洗涤 6 次, 加入 1:5 000 HRP-羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h, 0.5% PBST 洗涤 6 次。四甲基联苯胺 (TMB) 底物液显色后, 酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 试验重复 3 次。若预测表位肽与兔抗 His-VMH 抗体反应孔的平均 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ (P) 大于其与阴性血清反应孔的平均 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ (N) 的 2.1 倍 (95%可信度), 同时与兔抗 His 标签蛋白抗体反应孔的平均 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 小于阴性血清的 2.1 倍, 则说明抗 VMH 抗体特异性识别了预测表位肽, 初步认为该预测表位是 VMH 蛋白的 B

细胞线性表位。

1.4.3 预测表位肽的抑制性免疫印迹反应 进一步通过抑制性免疫印迹反应验证预测表位的真实性。即融合蛋白 His-VMH 经 SDS-PAGE 电泳后, 采用半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 漂洗 3 次。将合成的预测表位肽和无关对照肽用无菌去离子水配成浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (经预试验确定的浓度) 的多肽溶液, 并分别与 1:800 倍稀释的兔抗 His-VMH 纯化抗体等体积混合, 37°C 预孵育 1 h, 然后将 PVDF 膜放入混合液中, 室温振荡作用 1 h, PBST 漂洗 6 次, 加入 1:5 000 倍稀释的 HRP-羊抗兔 IgG, 室温振荡作用 1 h, PBST 漂洗 6 次, 最后用 DAB 显色, 分析预测表位肽是否可与兔抗 His-VMH 纯化抗体发生特异性结合反应而抑制该抗体与融合蛋白 His-VMH 的反应。试验中同时设置融合蛋白和 His 标签蛋白的免疫印迹反应对照。

1.4.4 预测表位肽的溶血活性检测 采用平板溶血试验检测预测表位的溶血性。即向 96 孔 V 型血凝板中加入 pH 7.2、 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无菌 PBS, $30 \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 。将 $30 \mu\text{L}$ 浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的合成预测表位肽加入第

一孔, 充分混匀稀释后, 取 $30 \mu\text{L}$ 稀释液至第 2 孔混匀, 以此类推稀释至第 11 孔, 第 12 孔做红细胞对照。各孔加入等体积 2% 鲫鱼红细胞, 血凝板置震荡器上轻轻混匀 1 min 后, 放入湿盒内于 30°C 培养箱中作用 12 h, 观察溶血情况, 以能使 50% 红细胞溶解的预测表位肽最高稀释度为其溶血价。试验中同时设置 rVMH 蛋白阳性对照与无关对照肽阴性对照。

2 结果与分析

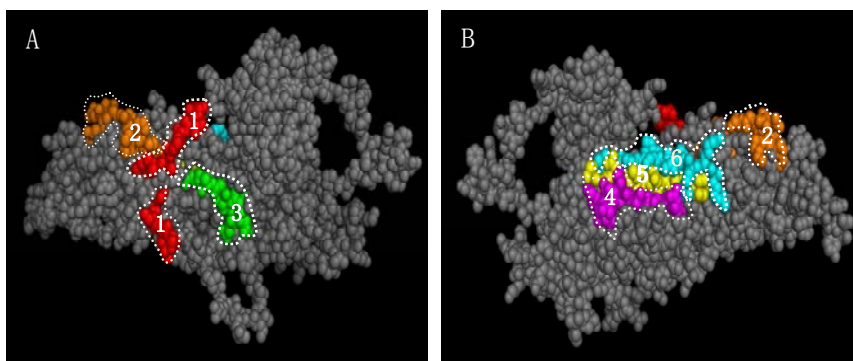
2.1 预测的 VMH 蛋白 B 细胞线性表位及其在蛋白三维结构中位置

ABCpred 方法以 12 个氨基酸为单位进行表位预测, 结果显示分值在 0.6 以上具有部分重叠的潜在表位有 22 个, 而 BepiPred 方法预测结果显示分值在 0.6 以上的潜在表位有 23 个。综合两种预测方法的共有肽段和预测得分 (>0.6), 最终获得 6 个可能的 VMH 蛋白 B 细胞线性表位, 它们分别位于该蛋白 N 端第 130~141、192~203、236~247、281~292、425~436 和 464~475 位氨基酸区域(表 1)。如图 1 所示, 以霍乱弧菌 Cytolysin (HlyA) Pro-Toxin 蛋白作为同源模板模建的 VMH 蛋白三维

表 1 预测的 B 细胞线性表位的氨基酸序列与位置

Table 1 The amino acid sequence and predicted the location of B-cell linear epitopes

预测表位 Predicted epitope	氨基酸序列 Amino acid sequence	序列位置 Sequence position	分值 Score
P ₁₃₀₋₁₄₁	EDVDPTLLEAPR	130aa~141aa	0.63
P ₁₉₂₋₂₀₃	LWKNDKGSRPFC	192aa~203aa	0.66
P ₂₃₆₋₂₄₇	RISLDDDDSTGAG	236aa~247aa	0.74
P ₂₈₁₋₂₉₂	DYRFSFNASNDK	281aa~292aa	0.61
P ₄₂₅₋₄₃₆	GSTDFVIDSSVN	425aa~436aa	0.79
P ₄₆₄₋₄₇₅	PRRRVTKSASFT	464aa~475aa	0.67



A 为 VMH 蛋白三维结构的前视图; B 为 VMH 蛋白三维结构的后视图。1、2、3、4、5 和 6 号区域分别代表预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₂₈₁₋₂₉₂、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅

A represents front view of VMH protein 3D structure; B represents postback view of VMH protein 3D structure. No.1, 2, 3, 4, 5 and 6 regions represent predicted epitope P₁₃₀₋₁₄₁, P₁₉₂₋₂₀₃, P₂₃₆₋₂₄₇, P₂₈₁₋₂₉₂, P₄₂₅₋₄₃₆ and P₄₆₄₋₄₇₅, respectively

图 1 VMH 蛋白的三维结构及预测表位在三维结构中的位置

Figure 1 The 3D structure of VMH protein and predicted the location of epitopes in 3D structure

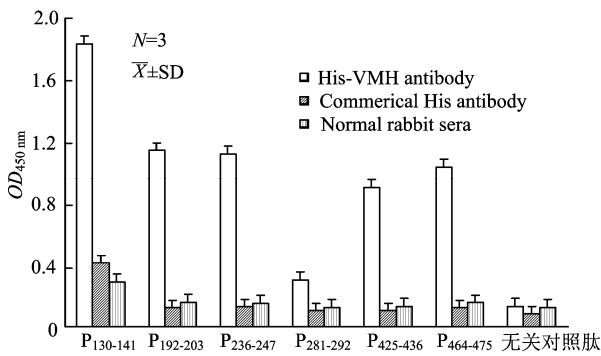
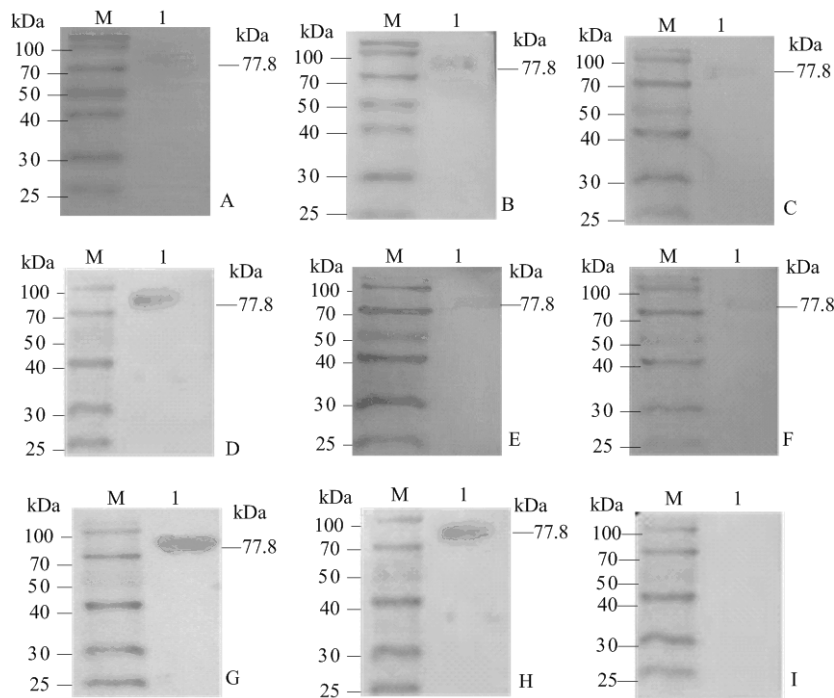


图 2 预测表位与不同抗体间免疫反应性的肽 ELISA 检测
Figure 2 Immunoreactivity of the predicted epitopes with different antibodies detected by peptide-ELISA



A~F分别为预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₂₈₁₋₂₉₂、P₄₂₅₋₄₃₆和 P₄₆₄₋₄₇₅的抑制性免疫印迹反应; G为 His-VMH 抗体与融合蛋白 His-VMH 的免疫印迹反应; H为无关对照肽的抑制性免疫印迹反应; I为 His 标签蛋白的免疫印迹反应

A-F. Inhibitory immunoblotting of predicted epitope P₁₃₀₋₁₄₁, P₁₉₂₋₂₀₃, P₂₃₆₋₂₄₇, P₂₈₁₋₂₉₂, P₄₂₅₋₄₃₆ and P₄₆₄₋₄₇₅, respectively; G. Immunoblotting of His-VMH protein with anti-His-VMH antibody; H. Inhibitory immunoblotting of unrelated control peptide; I. Immunoblotting of His-tag protein with anti-His-VMH antibody.

图 3 免疫印迹与抑制性免疫印迹结果

Figure 3 The results of immunoblotting and inhibitory immunoblotting

2.3 预测表位的抑制性免疫印迹反应结果

为了进一步验证肽 ELISA 结果的特异性, 采用抑制性免疫印迹反应检测预测表位肽能否抑制抗 His-VMH 纯化抗体与融合蛋白 His-VMH 的特异性反应。结果如图 3 所示, 在免疫印迹反应中 His-VMH 抗体与融合蛋白 His-VMH 作用后在约 77.8 kDa 位置出现一明显免疫反应条带 (图 3-G, 阳性对照), 而与 His 标签蛋白无反应条带 (图 3-I, 阴性对照), 说明抗 VMH 抗体与 VMH 蛋白发生了特异性结合

结构较为规则, 预测表位 P₁₉₂₋₂₀₃ (橙色区域) 完全暴露于三维结构表面, 其余 5 个预测表位的大部分肽段暴露于三维结构表面。

2.2 预测表位的肽 ELISA 鉴定

采用肽 ELISA 方法鉴定预测表位肽与兔抗 His-VMH 纯化抗体的结合反应性。结果如图 2 所示, 6 个预测表位肽均能与 His-VMH 纯化抗体发生结合反应 ($P/N > 2.1$), 而不能与抗 His 标签蛋白抗体发生反应 ($P/N < 2.1$), 同时无关对照肽与两种抗体均不发生反应 ($P/N < 2.1$), 初步认为这 6 个预测表位是 VMH 蛋白的 B 细胞线性表位。

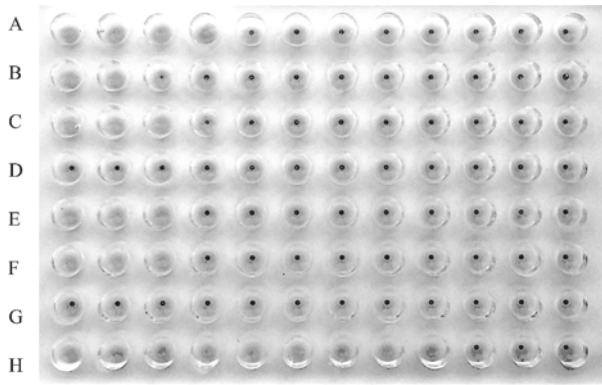
反应。在抑制性免疫印反应中预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆和 P₄₆₄₋₄₇₅均能够明显抑制抗 VMH 抗体与 VMH 蛋白的免疫反应, 在约 77.8 kDa 位置仅出现微弱的反应条带 (图 3-A、B、C、E 和 F); 预测表位 P₂₈₁₋₂₉₂和无关对照肽均不能抑制抗 VMH 抗体与 VMH 蛋白的免疫反应, 在约 77.8 kDa 位置出现明显反应条带 (图 3-D 和 H)。

2.4 预测表位的溶血活性

如图 4 所示, 浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 rVMH 纯化

蛋白及预测表位肽 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 均具有溶血活性, 溶血价分别为 1:512、1:32、1:8、1:8、1:8 和 1:8, 而预测表位肽 P₂₈₁₋₂₉₂ 及无关对照肽均无溶血活性。

综合肽 ELISA、肽抑制性免疫印迹反应和溶血活性试验的结果, 可以确定预测表位肽 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 是拟态弧菌 VMH 蛋白的真正 B 细胞线性表位。



A~F.分别为预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₂₈₁₋₂₉₂、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 的溶血价; G为无关对照肽阴性对照; H为 rVMH 蛋白阳性对照

A-F. The hemolytic titer of predicted epitope P₁₃₀₋₁₄₁, P₁₉₂₋₂₀₃, P₂₃₆₋₂₄₇, P₂₈₁₋₂₉₂, P₄₂₅₋₄₃₆ and P₄₆₄₋₄₇₅, respectively; G. Negative control of unrelated control peptide; H. Positive control of rVMH protein

图 4 预测表位的溶血价测定

Figure 4 Determination of the hemolytic titer of predicted epitopes

3 讨论

近 10 年来, 预测线性 B 细胞表位的软件及相关数据库得到较快发展, 其中 ABCpred 和 BepiPred 软件预测的准确性较高。ABCpred 是基于人工神经网络预测线性 B 细胞表位的服务器。在一个含 700 个非冗余 B 细胞表位和 700 个随机肽组成的数据集上, 以不同的窗口长度训练和测试, 当窗口长为 16 个氨基酸时, 预测结果的准确率可达 65.93%^[10]。BepiPred 则是在构建隐形马尔可夫模型的基础上结合氨基酸的性质(亲水性、柔韧性、可及性、暴露表面和转角)来预测线性 B 细胞表位的服务器^[11]。与仅依赖于氨基酸性质的预测方法相比, BepiPred 预测结果的准确性得到提高。本研究联合使用 ABCpred 和 BepiPred 网络服务器综合分析预测拟态弧菌 VMH 蛋白 B 细胞线性表位并将其展示于该蛋白三维结构上, 共筛选出 6 个位于三维结构表面的最可能表位肽, 并进行免疫学试验验证。结果显示其中 5 个预测表位均为 VMH 蛋白真正的 B 细胞线

性表位, 表明同时使用两种或多种软件综合预测并结合蛋白三维结构分析法可明显提高表位预测的准确率。

由于人工合成的预测表位多肽较短, 一般只有十几个氨基酸, 无法采用免疫印迹法进行鉴定, 因此常采用肽 ELISA 方法鉴定预测的 B 细胞表位。ELISA 操作简便, 敏感性和特异性较高, 但 ELISA 试验结果受试剂质量与抗体纯度的影响较大, 仍然存在一定的假阳性反应。因此, 肽 ELISA 初筛呈阳性反应的预测表位仍需通过特异性更高的肽抑制性免疫印迹反应加以确证。本研究的结果也证实了这一点, 虽然肽 ELISA 结果显示 6 个预测表位肽均与抗 VMH 抗体发生了结合反应, 但在肽抑制性免疫印迹反应中发现预测表位 4 并不能抑制抗 VMH 抗体与 VMH 蛋白发生特异性免疫印迹反应, 也无溶血活性; 而其余 5 个预测表位均能明显抑制抗 VMH 抗体与 VMH 蛋白间的免疫印迹反应, 且具有溶血活性, 从而确证了预测表位 P₁₃₀₋₁₄₁、P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 为真正表位, 但这些表位是否具有免疫保护性, 尚需通过动物免疫保护性试验加以验证。

对拟态弧菌热不稳定性溶血素 *Vmh* 基因进行生物信息学分析, 发现该基因全长 2 232 bp, 编码由 744 个氨基酸组成的 VMH 蛋白。Kim 等^[12]根据 VMH 蛋白的二硫键位置及其与霍乱弧菌溶血素的高度同源性, 将 VMH 蛋白分成 N 端区域(1~185 aa)、中心区域(186~552 aa)和 C 端区域(553~744 aa) 3 个功能区, 并推测 N 端区域前 25 aa 具有信号肽功能; 中心区域 305~396 aa 之间含有一个蓖麻毒素 β 链的血凝素域而发挥溶血功能; C 端区域在维持 VMH 蛋白正确折叠过程中均起作用。本研究采用微量板溶血试验检测 5 个表位肽的溶血活性, 发现除位于 VMH 蛋白中心区域的表位 P₁₉₂₋₂₀₃、P₂₃₆₋₂₄₇、P₄₂₅₋₄₃₆ 和 P₄₆₄₋₄₇₅ 均具有溶血活性外, 位于 N 端区域的表位 P₁₃₀₋₁₄₁ 也具有溶血活性, 且其溶血价(1:32)高于中心区域表位的溶血价(1:8), 提示 VMH 蛋白 N 端区域在溶血过程也发挥重要作用, 但其作用机制有待于深入研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] ZHANG X, LI Y W, MO Z Q, 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.
- [3] GUARDIOLA-AVILA I, NORIEGA-OROZCO L, ACEDO-FÉLIX E, et al. Presence of the hemolysin gene of *Vibrio mimicus* in fish and seafood products in Sonora, México[J]. J Food Res, 2015, 4(1): 66-76.
- [4] ALAM M, MIYOSHI S, SONODA Y, et al. Role of a protease in the adherence and enterotoxicity of *Vibrio mimicus* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(1): 37-41
- [5] LI Y, OKAMOTO K, TAKAHASHI E, et al. A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators[J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(1): 73-78.
- [6] LI T, KOBAYASHI A, TAKATA N, et al. Role of the enterotoxic hemolysin in pathogenicity of *Vibrio mimicus*[J]. J Health Sci, 2008, 54(6): 686-691.
- [7] 李涛, 吴后波. 最小弧菌热不稳定型溶血素表达载体的构建和高效表达[J]. 台湾海峡, 2007, 26(2):242-248.
- [8] 马凡舒, 张蕾, 王洋, 等. B 细胞抗原表位预测方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1): 63-67.
- [9] 肖宁, 曹际, 孔令严, 等. 拟态弧菌 VMH 蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(7): 770-774.
- [10] SAHA S, RAGHAVA G P S. Prediction of continuous B - cell epitopes in an antigen using recurrent neural network[J]. Proteins, 2006, 65(1): 40-48.
- [11] LARSEN J E P, LUND O, NIELSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes[J]. Immunome Res, 2006, 2(2): 7580-2.
- [12] KIM G T, LEE J Y, HUH S H, et al. Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1360(2): 102- 104.
- [13] 杨军, 刘妮, 张婷, 等. HBeAg 的 B 细胞线性表位预测及鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(2): 253-257.
- [14] 马凡舒, 张蕾, 王洋, 等. 水貂阿留申病病毒 NS1 蛋白 B 细胞抗原表位的分析与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(2): 210-216.
- [15] HASTE ANDERSEN P, NIELSEN M, LUND O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures[J]. Protein Sci, 2006, 15(11): 2558- 2567.