

文章编号: 1000-0615(2008)06-0939-06

黏红酵母表面黏附蛋白及肠黏液受体的初步研究

李 正^{1,2}, 李 健², 刘 淇², 王 群²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为获得对大菱鲆肠道具有较强黏附能力的益生菌株, 了解其黏附机制, 采用体外黏液黏附模型及 Western-blot 技术, 对黏红酵母等 4 株益生菌的大菱鲆肠黏液黏附性能及黏红酵母表面粘附蛋白和肠黏液受体进行了初步研究。结果表明, 4 株益生菌均可黏附于大菱鲆肠黏液; 但各菌株的黏附能力存在较大差异, 其中黏红酵母黏附能力最强, 鼠李糖乳杆菌次之, 假丝酵母和枯草芽孢杆菌相对较低。黏红酵母表面蛋白预先与肠黏液孵育 2 h 后, 显著抑制了黏红酵母与肠黏液的结合, 其黏附百分率下降了 83.6%; 但上述处理对其他 3 株益生菌的黏附没有明显影响。Western-blot 显示黏红酵母表面蛋白中分子量为 38.5 ku 和 28.6 ku 的两个蛋白参与对肠黏液的黏附过程, 大菱鲆肠黏液中分子量为 27.3 ku 和 22.3 ku 两个蛋白可与黏红酵母表面蛋白特异性结合。糖原染色显示上述 4 个蛋白均为糖蛋白。

关键词: 黏红酵母; 黏附蛋白; 黏液受体; 大菱鲆

中图分类号: Q 513

文献标识码: A

黏附是益生菌的表面黏附素与宿主表面受体的相互作用, 是益生菌定植宿主、发挥生理作用的关键步骤, 也是益生菌筛选的一个重要指标^[1]。肠黏液层是益生菌生存的直接环境并为其提供黏附位点, 黏液粘附能力对益生菌在肠道存留及后续效应的发挥有重要影响, 因此研究益生菌的黏附特性及作用机制具有一定的理论意义和应用价值。

酵母、乳酸菌和枯草芽孢杆菌是水产养殖中应用较广泛的有益微生物, 在促进动物生长^[2-3], 刺激消化道功能成熟^[4], 增强机体免疫^[5]等方面已有较深入研究。但在水产领域对益生菌的黏附研究尚处于起步阶段。王福强^[6]发现乳酸菌 P15 和干酪乳杆菌在牙鲆体表及肠黏液中均有粘附性, 并对霍乱弧菌等具有黏附抑制作用。Andlid 等^[7-8]的研究表明汉逊德巴利酵母和啤酒酵母对虹鳟肠黏液均有较强黏附能力, 黏红酵母可定植虹鳟肠道。

本研究拟采用体外黏附模型评价黏红酵母等四株益生菌对大菱鲆肠黏液的黏附特性, 并对黏红酵母表面粘附蛋白及其肠黏液受体进行初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及培养条件 黏红酵母(*Rhodotorula glutinis* ACCC 2125), 假丝酵母(*Candida* sp. ACCC 2121), 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 本实验保存。酵母、鼠李糖乳杆菌、枯草芽孢杆菌分别采用麦氏琼脂、MRS、LB 培养基, 30 ℃, 摇床振荡培养。

主要试剂和仪器 辣根过氧化物酶(HRP, Sigma 公司), 电泳仪, 湿式电转仪(北京

收稿日期: 2007-07-03

资助项目: 国家自然科学基金(30700617); 科技部科研院所社会公益研究专项(2004DIB4J165); 公益性农业行业科研专项(nyhyzx07-046)

作者简介: 李 正(1979-), 男, 湖南武冈人, 博士研究生, 从事微生物生态制剂研究。Tel: 13780624762, E-mail: lizh45@163.com

通讯作者: 李 健, Tel: 0532-85830183, E-mail: Lijian@ysfri.ac.cn

六一仪器公司),DAB 浓缩显色液(中杉金桥生物科技有限公司),SPA 试剂盒(上海仁宝医用试剂研究有限公司)。

实验用鱼 体重 400~500 g 的健康大菱鲆 50 尾,购自中国水产科学研究院黄海水产研究所海阳试验基地。水温(20±2)℃,按常规的养殖程序管理。

1.2 大菱鲆肠黏液的制备

参考鄢庆彬等^[9]方法:大菱鲆解剖取肠,无菌生理盐水冲洗 3 次,放入无菌培养皿中,剪开肠壁,钝塑料片轻轻刮取肠黏液,放入 0.01 mol·L⁻¹ 无菌 PBS(pH 7.4)中混匀,离心 2 次(4℃、12 000×g),每次 15 min。取上清液,依次用 0.45 μm、0.22 μm 滤膜过滤除菌。利用 Bradford 法^[10]测定蛋白含量,用 0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)调整蛋白浓度 1 mg·mL⁻¹ 后在 -20℃ 保存备用。

1.3 黏红酵母表面蛋白的提取

采用 Casanova 等^[11]方法稍加调整:将活化两次的黏红酵母按 50 mL·L⁻¹ 的比例接种于新鲜的麦氏液体培养基中。30℃ 振荡培养 18 h,离心(5 000 r·min⁻¹、4℃、15 min)收集菌体,并用冷的 PB(0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4)缓冲液洗涤 2 次,加 10 倍菌体湿重的 PB 悬浮菌体。菌悬液添加(-巯基乙醇(1% v/v)、甘露醇(0.1 mol·L⁻¹),37℃ 振荡 30 min 后,离心 20 min(4℃、12 000 r·min⁻¹),收集上清,上清在 0.01 mol·L⁻¹ PBS 中 4℃ 透析过夜,收集样品,冷冻干燥后 -20℃ 保存备用。

1.4 肠黏液和酵母表面蛋白的辣根过氧化物酶(HRP)标记

根据 Rojas 等^[12]的方法稍加改动:将经过醛化处理的 HRP 用 0.2 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液(pH 9.5)调节至 pH 9.0~9.5。取 1 mL 浓缩的黏液蛋白或表面蛋白(2 mg·mL⁻¹)与 1 mL HRP(2 mg·mL⁻¹)混合,室温下搅拌 2 h,然后加入新鲜配制的硼氢化钠振荡 2 h,混合液 4℃ 对硼酸缓冲液充分透析,标记好的黏液蛋白及酵母表面蛋白等体积加入 800 mL·L⁻¹ 甘油, -20℃ 保存备用。

1.5 益生菌与大菱鲆肠黏液的黏附

参考 Prunier 等^[13]方法略作修改:肠黏液(1 mg·mL⁻¹)100 μL 加入 96 孔培养板,4℃ 固定

过夜。200 μL PBS 洗涤两次,除去未黏附黏液;加 100 μL 益生菌悬液(10⁸ cell·mL⁻¹),30℃ 孵育 2 h。PBS 洗涤两次,除去未黏附的益生菌;加 50 μL PBS 及 20 μL MTT(5 mg·mL⁻¹),30℃ 孵育 1 h 后,加裂解液(20% SDS-50% DMSO)振荡 30 min。酶标仪测定各孔吸光度值(λ=490 nm)。每个实验做 3 个重复。脱脂奶粉作阴性对照组。益生菌黏附率=(A₁-A_空)/(A₀-A_空)×100%,其中 A₁、A₀、A_空 分别是试验组、益生菌原液、空白对照组吸光度值。黏附抑制试验方法:先将提取的酵母表面蛋白与固定肠黏液作用 2 h,后续步骤参照前述的黏附方法进行。数据用 SPSS 软件进行方差分析。

1.6 酵母表面蛋白与肠黏液蛋白的凝胶电泳和 Western-blotting

表面蛋白与黏液蛋白的 SDS-PAGE 参数:5% 浓缩胶,12% 分离胶;恒压,浓缩胶 70 V 30 min;分离胶 130 V 120 min。电泳完毕,一部分胶用考马斯亮蓝 R-250 进行染色,另一部分胶采用湿式电转法,130 V 恒压 3 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后将 HRP 标记的黏液蛋白或表面蛋白分别与 PVDF 膜上的蛋白 30℃ 孵育 2 h,洗涤后加入 DAB 显色试剂,棕色条带即为目的蛋白。黏液蛋白非变性凝胶电泳,浓缩胶和分离胶浓度改为 3.6%、9%,其他与上述步骤相同。

1.7 表面蛋白与黏液蛋白的糖原染色

按照 SPA 试剂盒说明书进行染色。

2 结果

2.1 黏红酵母等四株益生菌与肠黏液的黏附

黏红酵母等 4 株益生菌均可黏附于大菱鲆肠黏液,且黏附率明显高于脱脂奶粉组;但各菌株的黏附能力差异较大,其中黏红酵母黏附率最高,鼠李糖乳杆菌次之,假丝酵母和枯草芽孢杆菌的黏附率都较低,与黏红酵母及鼠李糖乳杆菌相比差异显著($P<0.05$)(表 1)。用黏红酵母表面蛋白预先与肠黏液孵育 2 h 后,显著抑制了黏红酵母与肠黏液的结合,其黏附率下降了 83.6%,但表面蛋白与肠黏液的预处理对其它 3 株益生菌的黏附没有明显影响。

2.2 黏红酵母表面黏附相关蛋白的鉴定

黏红酵母经 β-巯基乙醇和甘露醇处理 30 min

表 1 黏红酵母等 4 株益生菌对脱脂奶粉及大菱鲆肠黏液的黏附率

Tab. 1 Adhesion of *R. glutinis*, *C. sp.*, *L. rhamnosus*, *B. subtilis* to skim milk and turbot mucus $\bar{X} \pm SD\%$, $n=3$

	脱脂奶粉 skim milk	大菱鲆肠黏液 mucus of Turbot	表面蛋白预处理大菱鲆肠黏液 pre-treated mucus of Turbot by surface protein
黏红酵母(<i>R. glutinis</i>)	3.3±0.3	22.8±2.5 ^a	3.7±0.6
假丝酵母(<i>C. sp.</i>)	2.8±0.1	8.1±1.1 ^b	7.8±0.9
鼠李糖乳杆菌(<i>L. rhamnosus</i>)	5.2±0.5	18.7±1.7 ^a	17.8±2.1
枯草芽孢杆菌(<i>B. subtilis</i>)	1.1±0.1	6.9±1.3 ^b	5.3±0.8

注: a, b 表示同一栏内具不同字母者差异显著($P<0.05$)

Notes: Significance level was $P<0.05$ between values scripted with different letters

后,经染色观察仍保持活性,说明提取的蛋白是酵母表面蛋白成分。SDS-PAGE 显示,表面蛋白成分非常丰富;转至 PVDF 膜后,用 HRP 标记的黏液蛋白与之进行杂交,发现分子量为 38.5 ku 和 28.6 ku 的两条蛋白带呈阳性(图 1)。

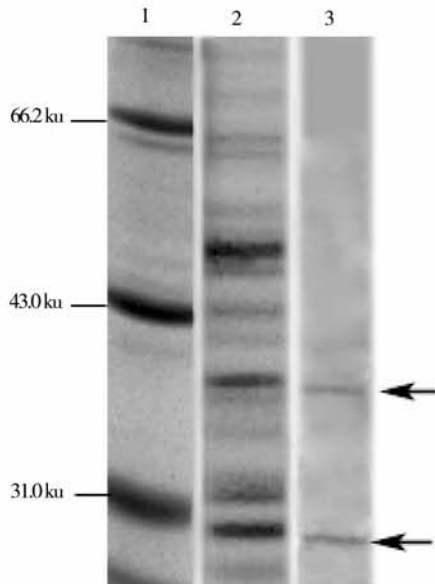


图 1 黏红酵母表面蛋白 SDS-PAGE 及与肠黏液的免疫印迹

1. Maker; 2. 表面蛋白; 3. 表面蛋白与 HRP 标记肠黏液的印迹

Fig. 1 Surface proteins of *R. glutinis* participated in adhesion to mucus of turbot

1. Maker; 2 surface proteins of *R. glutinis*; 3. specific proteins of *R. glutinis* participated in adhesion

2.3 肠黏液参与黏附的蛋白成分鉴定

用 HRP 标记的酵母表面蛋白与转至 PVDF

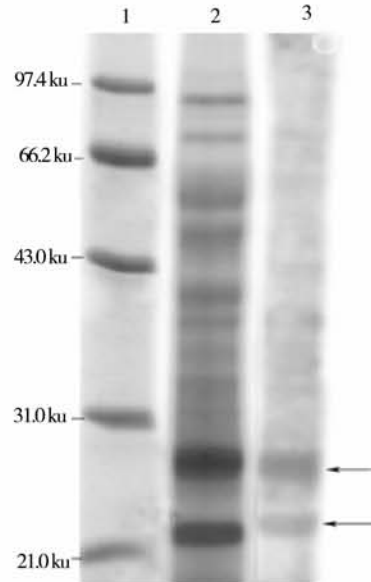


图 2 肠黏液蛋白 SDS-PAGE 及与表面蛋白的免疫印迹

1. Maker; 2. 肠黏液; 3. 肠黏液与 HRP 标记表面蛋白的印迹

Fig. 2 proteins in the mucus participated in adhesion

1. Maker; 2. mucus protein; 3. Specific protein participated in adhesion

膜的肠黏液进行杂交,分子量为 27.3 ku 及 22.3 ku 的两条蛋白带呈阳性(图 2)。为进一步确定酵母表面蛋白与天然状态的肠黏液的黏附,利用非变性不连续梯度凝胶电泳对肠黏液进行分离,然后用 HRP 标记的酵母表面蛋白进行免疫印迹,结果有一条黏液蛋白主带与表面蛋白呈阳性(图 3)。

2.4 黏液蛋白和表面蛋白的糖基鉴定

PAS 染色结果说明表面蛋白和黏液蛋白均为糖蛋白。

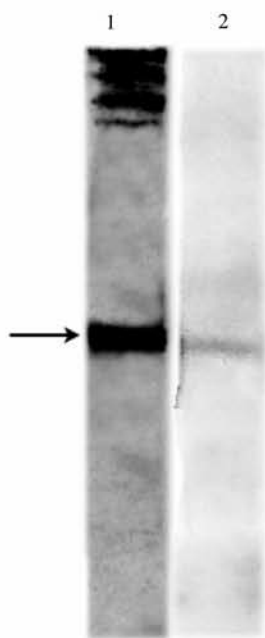


图3 肠黏液蛋白非变性凝胶电泳及与表面蛋白的免疫印迹

1. 肠黏液; 2. 肠黏液与 HRP 标记表面蛋白的印迹

Fig. 3 Proteins in the mucus participated in adhesion

1. mucus protein; 2. specific proteins in the mucus participated in adhesion

3 讨论

黏液层覆盖在黏膜上皮表面形成胶体屏障,保护机体免受病原微生物侵袭,同时为肠道微生物提供黏附位点^[14]。黏液黏附能力被认为是致病菌一个重要的致病因子。Louis 等^[15]对白假丝酵母等 9 株致病酵母的黏液黏附能力与致病性的相关性研究发现,上述酵母的毒力与其黏附能力直接相关。益生菌则通过在消化道黏膜的黏附,以占位排斥或其他方式抑制病原菌与上皮细胞上的接触^[16-17]。粘液黏附能力与益生菌的体内定植的相关性已被一些实验证实。王福强等^[18]从牙鲆肠道分离到一株乳酸菌 L15,该菌株具有较强的黏液黏附能力,体内试验也表明其能很好定植于牙鲆肠道,并显著降低了肠道弧菌的数量,进而提高牙鲆稚鱼的成活率和生产性能。Byun 等^[19]对乳杆菌 DS-12 在牙鲆肠道黏附定植及对肠道菌群的影响,也得到了相似的结果。本试验发现黏红酵母和鼠李糖乳杆菌对大菱鲆肠黏液具有较强的黏附能力,推测其在大菱鲆肠道可能具有较好的定植潜能,结合体外弧菌抑菌试验,这两株

益生菌在大菱鲆养殖中可能具有较好的应用前景。

黏红酵母与大菱鲆肠黏液的黏附能被其表面蛋白明显抑制,说明其表面蛋白在黏附中起重要作用。这与表面蛋白介导微生物黏附的结论一致^[20]。Western-blot 结果显示黏红酵母表面蛋白中分子量为 38.5 ku 和 28.6 ku 的蛋白可特异性与肠黏液结合。SPA 染色结果显示这两种蛋白为糖蛋白。有研究表明,糖蛋白的糖基成份在介导对微生物的黏附过程中起关键作用,通过添加糖类或高碘酸处理可显著抑制微生物的粘附能力。孙进等^[21]研究发现甘露糖对植物乳杆菌(*L. plantarum*) Lp6 的黏附有浓度依赖性的抑制作用,高碘酸处理也显著降低了其黏附能力。黏红酵母表面蛋白含有的糖基成分,在黏附过程中的作用将是下一步研究内容。Louis 等^[15]鉴定了白假丝酵母与兔肠黏液结合的表面黏附蛋白为 66.0 ku 的糖蛋白,这与本研究得到的两种黏附蛋白分子量差异较大,可能与菌种及宿主动物不同有关。类似的差异也存在乳酸菌之间。Alejung 等^[22]认为参与罗伊氏乳杆菌 NCIB11951 黏附的两个表面粘附蛋白属于 I 型胶原结合蛋白,其中分子量 29.0 ku 的蛋白其氨基酸序列含有两个典型的胞外受体连接的基序,上游一个开放阅读框与 ATP 连接组分有高度同源性;而 Chen 等^[23]研究发现分子量为 42.0 ku 的 S 层蛋白在唾液乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)黏附过程中起关键作用。本试验鉴定的 28.6 ku 的黏红酵母表面蛋白属于何种蛋白,还有待于蛋白测序后的深入分析。黏红酵母表面蛋白能明显抑制其对肠黏液的黏附,但对假丝酵母及其它两株益生菌的黏附没有影响,这可能与各菌株参与黏附的表面黏附素结构不同而导致大菱鲆肠黏液上的黏液受体不一致有关。

黏附是黏附素与其受体之间的特异性结合。黏红酵母与大菱鲆肠黏液具有较强黏附能力,可能与参与黏附的肠黏液受体蛋白含量有关。用 Gel-pro Analyzer 软件对大菱鲆肠黏液蛋白成分的半定量分析结果表明,分子量为 27.3 ku 和 22.3 ku 的两种蛋白含量约占肠黏液蛋白总量的 38.0%,也是肠黏液蛋白中的两条主要蛋白条带(图 2)。陈营等^[24]利用 Western-blotting 技术发现牙鲆肠黏液中分子量为 29.7 ku 和 30.3 ku、鲤肠黏液中 26.2 ku 的蛋白分别能与乳杆菌 L15、

嗜酸乳酸菌发生特异性结合。对比分析发现,这几种鱼类的黏液受体的分子量大小很接近,此外本试验也发现黏红酵母对大菱鲂和牙鲆黏液的黏附率相近,推测这些肠黏液蛋白之间可能存在一些共同的结构特点,Carlstedt 等^[12]也认为虽然不同动物肠黏液成分存在差异,但是主要大分子性质及结构存在相似性。为观察非变性黏液蛋白与酵母表面蛋白的相互作用情况,本试验采用非变性凝胶电泳对肠黏液蛋白进行分离及免疫印迹,结果证实存在一条主要蛋白带能与酵母表面蛋白结合,说明黏红酵母可黏附于天然条件下黏液蛋白。Rojas 对^[12]采用 PAGE、SDS-PAGE 分离的乳酸菌表面蛋白的印迹结果进行了比较分析,发现 SDS-PAGE 所得阳性蛋白条带为非变性蛋白的一个亚基,两株方法所得结果是一致的。本试验得到的非变性及变性蛋白质之间的相互关系,尚需要进一步确认。

参考文献:

- [1] Satu V, Johanna P, Matti K, *et al.* Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability [J]. *Research in Microbiology*, 2005, (156):238-244.
- [2] Tovar R D, Zambonino I J, Cahu C, *et al.* Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development [J]. *Aquaculture*, 2004, 234:415-427.
- [3] Macey B M, Coyne V E. Improved growth rate and disease resistance in farmed Halotiismidae through Probiotic treatment [J]. *Aquaculture*, 2005, 245: 249-261.
- [4] Wache Y, Auffray F, Gatesoupe F J, *et al.* Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry [J]. *Aquaculture*, 2006, 258:470-478.
- [5] Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar K R, *et al.* *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 343: 69-765.
- [6] 王福强. 牙鲆肠道益生菌的分离鉴定及应用研究 [D]. 中国农业大学博士学位论文,2004.
- [7] Andlid T, Ricardo V J, Gustafsson L. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(2): 115-126.
- [8] Andlid T, Jufirez R V, Gustafsson L. Yeast Colonizing the Intestine of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Microb Ecol*, 1995, 30: 321-334.
- [9] 鄢庆彬, 陈 强, 邹文政, 等. 不同环境条件对溶藻弧菌黏附大黄鱼肠黏液的影响 [J]. *水产学报* 2006,30(2):254-259.
- [10] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000:55-60.
- [11] Casanova M, Lopez-Ribot J L, Martinez J P, *et al.* Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques [J]. *Infect Immun*, 1992, 60: 4898-4906.
- [12] Rojas M, Ascencio F, Conway P L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2330-2336.
- [13] Prunier C, Howe P H. Disabled-2 (Dab2) Is Required for Transforming Growth Factor α -induced Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 17540-17548.
- [14] Uchida H, Kinoshita H, Kawai Y, *et al.* Lactobacilli binding human A-antigen expressed in the intestinal mucosa [J]. *Research in Microbiology*, 2006,157:659-665.
- [15] Louis D R, Francine A, Karine B, *et al.* Characterization of binding of *Candida albicans* to small Intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 2000, 68,(6):3172-3179.
- [16] 钟世顺, 张振书, 赖卓胜, 等. 双歧杆菌纯化黏附素对 ETEC 和 EPEC 黏附肠上皮细胞的竞争抑制作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29 (3): 243-245.
- [17] 马玉龙, 许梓荣, 尤 萍. 细菌对肉鸡肠黏液的黏附作用 [J]. *微生物学报*, 2004, 44(3):361-364.
- [18] 王福强, 吕于明, 陈 营, 等. 两株乳杆菌在牙鲆消化道的定植 [J]. *中国农业大学学报*, 2005, 10

- (1):1-5.
- [19] Byun J W, Park S Ch, Benno Y, *et al.* Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 1997, 43(5):305-308.
- [20] 王 斌, 魏 泓. 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(14):1762-1766.
- [21] 孙 进, 乐国伟, 施用晖, 等. 植物乳杆菌黏附大鼠小肠黏液及机制的研究 [J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(2):19-21.
- [22] Aleljung P, Shen W, Rozalska B, *et al.* Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus rteri* NCIB 11951[J]. *Curr Microbio*, 1994, 28:231-236.
- [23] Chen X Y, Xu J J, Shuai J B, *et al.* The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115:307-312.
- [24] 陈 营, 王 蕾, 安利国, 等. 乳杆菌表面黏附蛋白的提取、鉴定及黏附特异性的初步研究 [J]. *微生物学报*, 2006, 46(3): 397-400.

Preliminary research on the adhesion protein of *Rhodotorula glutinis* and the mucus receptor

LI Zheng^{1,2}, LI Jian², LIU Qi², WANG Qun²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources of the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to select probiotic strains with high adhesion capability to turbot intestinal mucus and understand the adhesion mechanism of *Rhodotorula glutinis*, the ability of *Rhodotorula glutinis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Candida* sp. and *Bacillus subtilis* adhering to the intestinal mucus of turbot (*Scophthatmus maximus*) was investigated *in vitro*, adhesion protein of *Rhodotorula glutinis* and mucus receptor were also identified. The results indicate all of the four probiotic strains can adhere to turbot intestinal mucus and significantly better than the BSA treatment. Adhesion percent of *R. glutinis* to intestinal mucus is the highest among the four probiotic strains. *C. ethanolica* and *B. subtilis* adhere to intestinal mucus but weakly. Furthermore, adhesion of *R. glutinis* to intestinal mucus was quantitatively inhibited by graded concentration of surface protein extracted from *R. glutinis*. However, the surface protein has no effect on the attachment of *C. ethanolica* and other two strains to the intestinal mucus. The adhesion protein extracted from the *R. glutinis* cell surface and intestinal mucus isolated from turbot intestine was visualized by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, native polyacrylamide gel electrophoresis and was identified by Western-blotting with horseradish peroxidase-labeled mucus or surface proteins. The results show that 38.5 ku and 28.6 ku protein of cell surface extraction involved in adherence of *R. glutinis* to mucus. Two kinds of protein in mucus can be recognized by the surface proteins of *R. glutinis*, the relative molecular weight is 27.3 ku and 22.3 ku, respectively. The above four kinds of proteins were identified as glycoproteins by PAS methods.

Key words: *Rhodotorula glutinis*; adhesion protein; mucus receptor; *Scophthatmus maximus*