

溶藻弧菌附着定植因子 ACFA 原核载体构建、 表达条件优化及多克隆抗体制备

刘 祥

(陕西理工学院 生物科学与工程学院,陕西 汉中 723001)

摘要:为构建水产致病菌溶藻弧菌附着定植因子 ACFA 原核表达载体,优化 ACFA 蛋白的诱导表达条件,制备 ACFA 蛋白小鼠多克隆抗体。通过分子克隆获得 ACFA 蛋白的表达菌株,利用切胶纯化获得 ACFA 蛋白,免疫小鼠制备多克隆抗体,采用 ELISA 法检测抗体滴度为 1:3 200 倍,Western-Blotting 法检测抗血清特异性较好。通过正交试验,获得 ACFA 菌株的最佳表达条件为:诱导时菌液 OD₆₀₀ 值 0.5,加 IPTG 终浓度 0.3 mmol/L,诱导时间 8 h,诱导温度 32 ℃;最佳培养条件为:葡萄糖浓度 0,转速 230 r/min,装液量 50 mL。

关键词:溶藻弧菌;ACFA 蛋白;正交试验;多克隆抗体

中图分类号:Q816 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0035-07

doi:10.7668/hbxb.2015.01.007

Construction Prokaryotic Vector, Optimization Expression Conditions and Polyclonal Antibody Preparation of *Vibrio alginolyticus* Accessory Colonization Factor ACFA

LIU Xiang

(College of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China)

Abstract: To construct prokaryotic expression vector of aquatic pathogenic *Vibrio alginolyticus* accessory colonization factor A (ACFA), optimize the expression condition of ACFA and prepare the polyclonal antibodies of mouse anti-ACFA. The ACFA expression strain was obtained by molecular clone. ACFA was purified by the way of the gel slices, immunized mice and prepared the polyclonal antibody. The antibody titer was 1:3 200 by ELISA, and Western-Blotting proved that the antiserum had good specificity. By the method of orthogonal experiment, the optimal inducing expressing condition of ACFA protein: strain OD₆₀₀ value, IPTG final concentration, inducing time and temperature, which were 0.5, 0.3 mmol/L, 8 h, 32 ℃, respectively; the optimal culture condition: glucose concentration, rotation rate, and medium volume, which were 0, 230 r/min and 50 mL, respectively.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; ACFA protein; Orthogonal experiment; Polyclonal antibody

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为革兰阴性菌,分布于海域、河口地区,是水产养殖引起弧菌病暴发的主要病原,发病率及死亡率高^[1-2];也可引起人类胃肠道疾病与伤口感染;是一种人和海洋动物共感染的病原菌^[3-4]。目前,防治弧菌疾病主要使用抗生素,尚无商业化疫苗的生产^[5],难以避免出现食品安全与环境污染问题^[6]。

附着定植因子(Accessory colonization factors,

ACFs)是最近几年发现的细菌致病菌毛调控蛋白^[7],研究发现其基因家族包括, *acfA*、*acfB*、*acfC* 以及 *acfD*^[8],合成的蛋白增强其对小鼠肠道的黏附作用,同时提高毒性^[9-10]。其中附着定植因子 A(Accessory colonization factor A, ACFA)是弧菌重要毒力蛋白之一,为 α 螺旋与无规则卷曲构成的分泌型蛋白^[11];C 端表现出较强同源性,可能在蛋白跨膜结构、维持细菌稳定性,以及促进细菌有效定植于宿主

收稿日期:2014-09-05

基金项目:陕西省教育厅科学研究计划项目(2013JK0723);陕西理工学院人才启动项目(SLGQD13-15)

作者简介:刘 祥(1983-),男,陕西汉中人,讲师,博士,主要从事蛋白质组学与免疫学研究。

肠道上起重要作用^[11-13];此外,将 ACFA 蛋白免疫鱼类,发现其可耐受溶藻弧菌的感染^[14]。因而,开发 ACFA 蛋白疫苗用于弧菌病的防治有很好的应用前景^[15-16]。

本研究利用分子克隆方法获得溶藻弧菌 ACFA 蛋白表达菌株;纯化 ACFA 蛋白,免疫小鼠,制备小鼠 ACFA 抗血清;通过正交试验确定 ACFA 最佳的表达条件与培养条件;为 ACFA 工业发酵与疫苗开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与试验动物 溶藻弧菌, *E. coli* DH5 α 菌株, *E. coli* BL21 菌株, pET-32a 质粒由陕西理工学院微生物实验中心保存;昆明鼠购于西安交通大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 限制性内切酶、*Taq* 酶、T4-DNA 连接酶、DNA Marker, Protein Marker, 均为 TaKaRa 公司产品;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒为上海生物工程有限公司产品;IPTG、蛋白胨、酵母粉购于美国 MP 公司;二抗购于 Sigma 公司,引物合成由西安沃尔森生物技术有限公司完成;其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的构建 根据 NCBI 公布溶藻弧菌的 *acfA* 基因,设计引物:Primer 1:5'-ACAGGATCC ATGAACAAAACACTTCTT-3';Primer 2:5'-CCTCTCG AGTTAGAAGTAATAAGTTGTG-3',下划线为限制性内切酶位点 *Bam*H I 和 *Xho* I。PCR 反应体系为 50 μ L:缓冲液 5 μ L,模板 3 μ L,10 mmol/L dNTP 2 μ L,25 μ mol/L 引物各 1.5 μ L,*Taq* 酶 0.5 μ L,补水至 50 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;32 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s);72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保温。将 PCR 产物与 pET-23a 质粒载体进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后,通过 T4-连接酶将目的基因插入 pET-32a 质粒中,转化 *E. coli* DH5 α 菌株,提取重组质粒后,进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,并对重组质粒进行序列测定,最后转化重组质粒入 *E. coli* BL21 表达菌株。

1.2.2 蛋白的表达检测与纯化 取重组菌株单克隆过夜培养,以 1:100 倍转接入新鲜的 LB 培养液,待 OD₆₀₀ 约 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h,收集 1 mL 菌体,蛋白电泳检测 ACFA 表达情况;并利用 SDS-PAGE 蛋白电泳

切胶的方法,对 ACFA 蛋白进行纯化。

1.2.3 ACFA 小鼠多克隆抗体制备 选取 4~5 周龄的昆明鼠,100 μ g/只免疫 ACFA 蛋白,第 1 次采用弗氏完全佐剂,免疫 14 d 后进行第 2 次免疫,第 2 次免疫 7 d 后,进行第 3 次免疫,免疫 7 d 后小鼠眼部取血。将血清于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜析出,离心后取上清,-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.4 ACFA 抗体效价与特异性检测 采用 ELISA 酶联法检测抗血清效价,主要步骤为:将 ACFA 蛋白溶解至 0.1 μ g/ μ L,在对应的 96 孔板中加入 100 μ L 抗原,37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h;倒空液体,洗涤液清洗 3 次,加入 300 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加 100 μ L 不同稀释度小鼠抗血清(每种稀释度均有 3 个重复),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;充分洗涤后加入 100 μ L 二抗(1:3 000 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;充分洗涤后,加入 50 μ L 底物 A 与 50 μ L 底物 B 的混合液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min,最后加入终止液,450 nm 读数。

利用 Western-Blotting 方法检测 ACFA 小鼠抗血清特异性^[17],主要步骤为:将溶藻弧菌过夜培养,收集菌体,SDS-PAGE 蛋白电泳,转 NC 膜,加入不同稀释度的小鼠抗血清(对照加入阴性抗血清),洗涤后,加入二抗孵育,最后 DAB 显色。

1.2.5 ACFA 系统发生分析 利用 NCBI 数据库中已公布的细菌 ACFA 氨基酸序列,通过 MEGA 5.02 软件进行聚类分析,并采用 Neighbour-Joining 方法构建系统发生树^[18]。

1.2.6 重组蛋白表达条件的优化 为筛选 ACFA 蛋白最佳表达条件,选用 L₉(3⁴) 正交试验模型,分为培养条件与蛋白诱导表达条件 2 个部分,因子与水平见表 1,2 所示^[19]。

表 1 ACFA 表达菌株培养条件的正交试验因子与水平

Tab.1 The fact and level of orthogonal experiment for culturing condition to ACFA expressing strain

因子 Factor	代号 Code	水平 Level		
		1	2	3
葡萄糖浓度/% Glucose concentration	a	0	0.4	1
转速/(r/min) Rotation rate	b	180	200	230
装液量/mL Medium volume	c	50	75	100

ACFA 菌株培养条件正交试验过程为:将重组菌株过夜培养 16 h,以 1:100 倍转接入正交试验模型要求的 LB 培养液中,并记录菌液最终的 OD₆₀₀ 值。

表2 ACFA 蛋白诱导条件正交试验的因子与水平

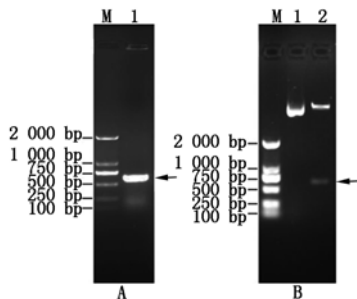
Tab.2 The fact and level of orthogonal experiment for ACFA induce condition				
因子 Factor	代号 Code	水平 Level		
		1	2	3
加 IPTG 菌 OD ₆₀₀ 值 Strain OD ₆₀₀ value	e	0.5	0.8	1
IPTG 终浓度/(mmol/L) IPTG final concentration	f	0.1	0.3	0.5
诱导时间/h Inducing time	g	3	8	12
诱导温度/℃ Inducing temperature	h	28	32	37

ACFA 菌株诱导表达条件正交试验过程为:根据菌株最适培养条件获得的结果,快速培养菌液到正交试验模型要求的菌液浓度,然后加入不同浓度的 IPTG,诱导相应的时间,收集 1 mL 菌液,离心,沉淀加入 300 μL 的 2 × SDS 蛋白上样缓冲液,沸水中煮样 5 min,取 10 μL SDS-PAGE 蛋白电泳。最后,利用 Phoretix 1D 软件对电泳获得的 ACFA 蛋白表达图谱进行光密度分析。

2 结果与分析

2.1 *acfA* 基因重组质粒载体的构建

以基因组 DNA 为模板,进行溶藻弧菌 *acfA* 基因的 PCR 扩增。获得约 650 bp 左右的基因片段,与预期大小一致(图 1-A)。从重组构建的 *E. coli* DH5α 质粒菌株中提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切获得约 650 bp 片段,与目的基因大小一致(图 1-B);序列测序结果显示与 NCBI 公布的基因序列相同,证明成功构建重组质粒。



M. DL2000 Marker; A. PCR 扩增 *acfA* 基因; 1. *acfA* 基因; B. *acfA* 基因重组质粒检测; 1. *acfA* 重组质粒; 2. *acfA* 重组质粒 *Bam*H I + *Xho* I 双酶切。
M. DL2000 Marker; A. *acfA* gene by PCR; 1. *acfA* gene; B. Identification of *acfA* gene recombinant plasmid; 1. *acfA* gene recombinant plasmid; 2. *acfA* recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I.

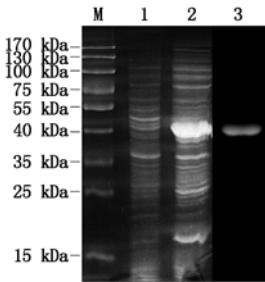
图1 溶藻弧菌 *acfA* 基因重组质粒构建

Fig.1 Construction recombinant plasmid of *V. alginolyticus acfA* gene

2.2 重组质粒菌株的表达检测与蛋白纯化

为验证重组蛋白的表达情况,将重组菌株经 IPTG 诱导后,收集菌体,蛋白电泳获得约 44 kDa 的条带,包含 ACFA 约 24 kDa,以及 pET-32a 质粒的 20.4 kDa 融合蛋白标签,重组蛋白的表达情况与预期大小一致;并利用 SDS-PAGE 蛋白电泳切胶的方

法纯化获得 ACFA 蛋白(图 2)。



M. Protein Marker; 1. 未诱导菌株; 2. IPTG 诱导菌株; 3. ACFA 蛋白纯化。
M. Protein Marker; 1. Did not induced strain; 2. IPTG induced strain; 3. The purification of ACFA protein.

图2 ACFA 蛋白表达与纯化

Fig.2 The expression and purification of ACFA protein

2.3 ACFA 抗血清效价与特异性检测

对获得的 ACFA 蛋白小鼠抗血清进行 ELISA 法检测,发现其抗体效价可以达到 1:3200 倍,如图 3

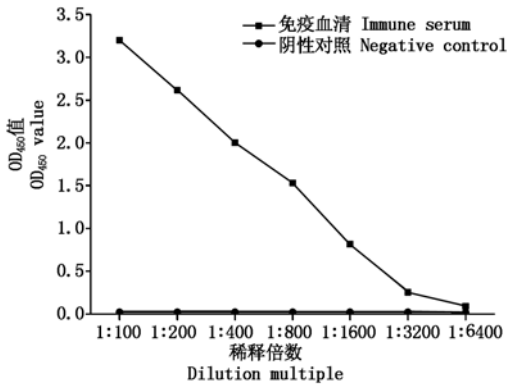
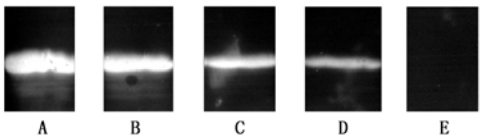


图3 ACFA 多克隆抗体效价的测定

Fig.3 Detection of the ACFA polyclonal antibody titer



A. 1:200 倍稀释的抗血清; B. 1:400 倍稀释的抗血清; C. 1:800 倍稀释的抗血清; D. 1:1600 倍稀释的抗血清; E. 1:200 倍稀释的阴性对照血清。

A. Dilution proportion of antibodies was 1:200; B. Dilution proportion of antibodies was 1:400; C. Dilution proportion of antibodies was 1:800; D. Dilution proportion of antibodies was 1:1600; E. Negative control (Dilution proportion of antibodies was 1:200).

图4 ACFA 多克隆抗体特异性的 Western-Blotting 检测

Fig.4 Identification of the specificity of ACFA polyclonal antibody by Western-Blotting

所示。利用 Western-Blotting 方法,发现不同稀释度 ACFA 抗血清出现明显条带,而对照无对应条带(图 4)。证明 ACFA 抗血清可与 ACFA 蛋白特异性结合,成功制备 ACFA 蛋白小鼠抗血清。

2.4 ACFA 蛋白的氨基酸序列系统进化树

根据 NCBI 公布的菌株 ACFA 蛋白氨基酸序列,利用 MEGA 软件构建 ACFA 系统进化树。发现

水产养殖中常见的弧菌属(*Vibrio*):副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)以及哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*),聚为一支,表明亲缘关系较近(图 5);间接说明 ACFA 蛋白在多种常见弧菌属致病菌中存在同源性,可能存在交叉的免疫保护作用。

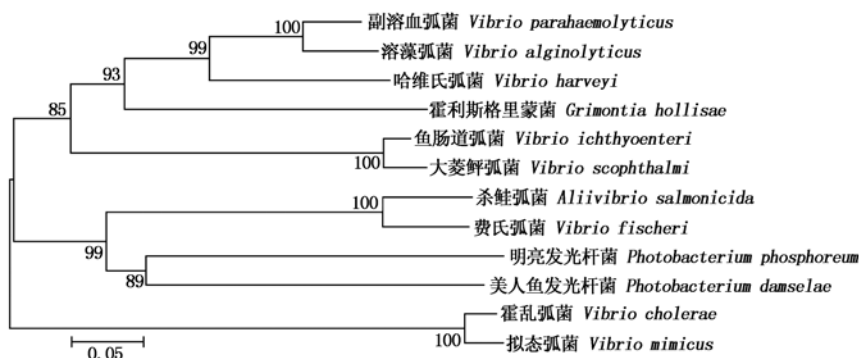


图 5 利用 MEGA 软件构建的 ACFA 氨基酸序列系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on ACFA amino acid sequences using MEGA

2.5 ACFA 菌株最适培养条件的正交试验

利用正交试验模型,3 次重复试验,获得 ACFA 菌株培养后的 OD₆₀₀ 值,如表 3 所示。极差分析结果显示,a1b3c1 为 ACFA 菌株最佳的培养条件,即培养基中不需要加入葡萄糖,转速 230 r/min,装液量

50 mL(表 4);方差分析结果显示,葡萄糖浓度、转速及装液量均达到显著性(表 5)。因而,在 ACFA 工程菌 IPTG 诱导前的培养时,不需要额外加入葡萄糖,可通过提高转速,进行菌体的快速培养。

表 3 ACFA 表达菌株培养条件试验的菌液浓度

Tab.3 The bacteria concentration for culture condition of ACFA expressing strain

试验号 Test number	试验组 OD ₆₀₀ 值 Experimental group OD ₆₀₀ value			平均值 Average	标准差 Standard deviation
	1	2	3		
a1b1c1	1.870	1.800	1.870	1.847	0.040
a1b2c2	1.753	1.767	1.747	1.756	0.010
a1b3c3	1.746	1.755	1.752	1.751	0.005
a2b1c2	1.712	1.73	1.791	1.744	0.041
a2b2c3	1.701	1.712	1.726	1.713	0.013
a2b3c1	1.846	1.841	1.801	1.829	0.025
a3b1c3	1.612	1.631	1.635	1.626	0.012
a3b2c1	1.761	1.768	1.754	1.761	0.007
a3b3c2	1.757	1.731	1.721	1.736	0.019

表 4 ACFA 表达菌株培养条件的极差分析

Tab.4 The range results for culture condition of ACFA expressing strain

均值分析		因子 Factor		
Mean value analysis		a	b	c
均值 1	Mean value 1	1.784	1.739	1.812
均值 2	Mean value 2	1.762	1.743	1.745
均值 3	Mean value 3	1.708	1.772	1.697
极差	Range	0.076	0.033	0.115

表 5 ACFA 表达菌株培养条件的方差分析

Tab.5 The variance results for culture condition of ACFA expressing strain

因子 Factor	OD ₆₀₀ 值分析 OD ₆₀₀ value analysis		
	均方根 Mean square	F 值 F value	显著性 Significant
a	0.014	21.238	*
b	0.003	4.465	*
c	0.030	46.027	*

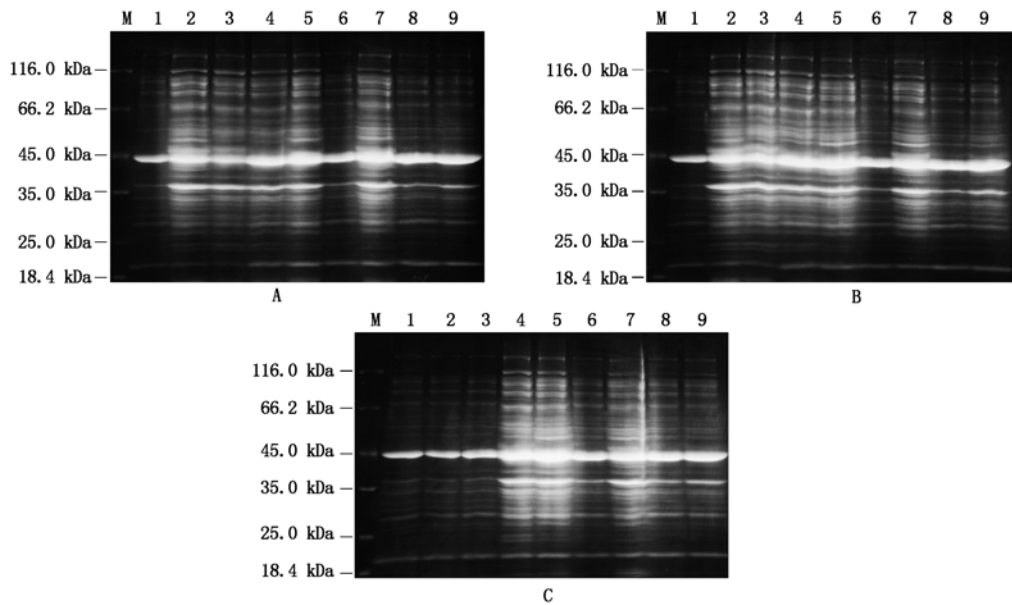
注: * $P < 0.05$, 与对照组相比存在差异。表 8 同。

Note: * $P < 0.05$, differs from control group. The same as Tab. 8.

2.6 ACFA 菌株 IPTG 诱导条件的正交试验

为确定 ACFA 蛋白的诱导表达情况,按照正交试验模型进行 3 次重复试验,利用 SDS-PAGE 蛋白电泳,获得 ACFA 蛋白表达图谱(图 6);利用软件 Phoretix 1D 分析 ACFA 蛋白表达量的光密度值(表 6)。数据极差分析结果显示,最佳 ACFA 蛋白表达

组合为 e1f2g2h2,即加 IPTG 时菌液 OD₆₀₀ 值为 0.5;加 IPTG 终浓度 0.3 mmol/L;诱导时间 8 h;诱导温度 32 ℃,如表 7 所示。方差分析显示,IPTG 浓度、诱导时间以及诱导温度均达到显著性(表 8)。可见,ACFA 工程菌诱导时应采用对数生长中期诱导、低浓度 IPTG、诱导时间不宜过长,且诱导温度不宜过高。



M. Protein Marker;1~3. IPTG 诱导 3 h,诱导温度为 28,32,37 ℃;4~6. IPTG 诱导 8 h,诱导温度为 28,32,37 ℃;7~9. IPTG 诱导 12 h,诱导温度为 28,32,37 ℃。
M. Protein Marker;1. Expression strain of ACFA without inducing by IPTG;1~3. Induced 3 h with IPTG, inducing temperature is 28,32,37 ℃, respectively;4~6. Induced 8 h with IPTG, inducing temperature is 28,32,37 ℃, respectively;7~9. Induced 12 h with IPTG, inducing temperature is 28,32,37 ℃, respectively。

图 6 ACFA 菌株 IPTG 诱导的正交试验

Fig. 6 The orthogonal experiment of ACFA expressing strain induced by IPTG

表 6 Phoretix 1D 软件分析 ACFA 表达图谱

Tab.6 The Phoretix 1D results of ACFA expressing map

试验号 Test number	试验组光密度值(× 10 ⁶) Experimental group optical density value			平均值(× 10 ⁶) Average	标准差(× 10 ⁶) Standard deviation
	1	2	3		
e1f1g1h1	1.868	1.840	1.740	1.816	0.067
e1f2g2h2	4.610	3.784	3.837	4.077	0.462
e1f3g3h3	3.296	3.294	3.516	3.369	0.127
e2f1g2h3	2.599	2.158	2.798	2.518	0.328
e2f2g3h1	3.306	3.455	3.407	3.389	0.076
e2f3g1h2	1.590	2.940	2.409	2.313	0.680
e3f1g3h2	3.152	3.324	3.277	3.251	0.089
e3f2g1h3	2.241	2.161	2.465	2.289	0.158
e3f3g2h1	3.523	3.246	3.500	3.423	0.154

3 讨论

溶藻弧菌给水产业带来巨大损失^[20],为抑制弧菌感染,往往导致抗生素滥用,引发细菌耐药性增强、水产品品质下降、水体污染等一系列问题。蛋白亚单位疫苗具有无毒、成本低、无耐药性等特点^[21-22],受到人们的高度重视。溶藻弧菌 ACFA 蛋

白具有较强的免疫原性,对鱼类有很好的免疫保护作用^[14]。本试验发现其氨基酸序列在常见的弧菌致病菌,如溶藻弧菌、副溶血弧菌以及哈维氏弧菌存在同源性,可能存在交叉免疫保护作用。因而,ACFA 蛋白亚单位疫苗在弧菌属感染上有很好的应用前景^[15-16]。

表 7 ACFA 蛋白表达图数据的极差分析

Tab. 7 The range results of ACFA expressing map data

均值分析		因子 Factor			
Mean value analysis		e($\times 10^6$)	f($\times 10^6$)	g($\times 10^6$)	h($\times 10^6$)
均值 1	Mean value 1	3.087	2.528	2.139	2.876
均值 2	Mean value 2	2.740	3.252	3.339	3.214
均值 3	Mean value 3	2.988	3.035	3.336	2.725
极差	Range	0.347	0.724	0.003	0.489

表 8 ACFA 蛋白表达图数据的方差分析

Tab. 8 The variance results of ACFA expressing map data

因子 Factor	光密度值分析 Optical density value analysis		
	均方根 Mean square	F 值 F value	显著性 Significant
e	0.287	2.984	
f	1.240	12.880	*
g	4.310	44.760	*
h	0.563	5.844	*

本研究成功构建溶藻弧菌 ACFA 表达菌株,获得纯化的 ACFA 蛋白,免疫小鼠制备了特异性较好的 ACFA 多克隆抗体,为研究 ACFA 蛋白功能与疫苗开发奠定基础。

此外,本试验设计正交试验模型,成功进行溶藻弧菌 ACFA 蛋白的培养条件、表达条件研究。ACFA 菌株最佳培养条件为 a1b3c1;葡萄糖浓度为 0,转速 230 r/min,装液量 50 mL;ACFA 蛋白最佳诱导表达条件为 e1f2g2h2,即加 IPTG 菌液 OD₆₀₀ 值 0.5,加 IPTG 浓度 0.3 mmol/L,诱导时间、诱导温度分别为 8 h 和 32 ℃。通过提高培养基转速,间接增加菌体营养与氧气的供给,利于菌株的生长^[23],这与本研究结果一致。本试验发现,低浓度 IPTG 增加蛋白的表达,这可能与 IPTG 的细胞毒性有关^[24],实际生产中应采用低浓度 IPTG 诱导。此外,合适的诱导时间与低温利于蛋白表达^[25],与本研究结果一致。因而,ACFA 工程菌蛋白发酵可采用两步法进行: IPTG 诱导前,提高培养基转速使菌体快速生长到诱导浓度; IPTG 诱导时:在菌株对数生长期加入低浓度 IPTG 诱导,并处于低温环境下,且诱导时间不宜过长。这为 ACFA 蛋白后续发酵生产奠定基础。

参考文献:

- [1] 魏 霜,洗钰茵,赵 晖,等.多重 PCR 检测四种食源性病原弧菌[J].中国农业科学,2013,46(8):1682 - 1686.
- [2] Takekawa N, Kojima S, Homma M. Contribution of many charged residues at the stator-rotor interface of the Na⁺-driven flagellar motor to torque Generation in *Vibrio alginolyticus*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(7):1377 -

1385.

- [3] 熊 盼,彭喜春,魏 霜,等.溶藻弧菌的毒力相关基因及其对小鼠的致病力[J].微生物学报,2014,54(1):80 - 88.
- [4] Yang Y, Bao C, Liu A, et al. Immune responses of prophe-noloxidase in the mud crab *Scylla paramamosain* against *Vibrio alginolyticus* infection; *in vivo* and *in vitro* gene silencing evidence[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2):237 - 244.
- [5] Sun Y, Liu C S, Sun L. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(4):595 - 599.
- [6] Alcaide E, Blasco M D, Esteve C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6):3348 - 3350.
- [7] Olivier V, Queen J, Satchell K J. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins[J]. PLOS One, 2009, 4(10):e7352.
- [8] Withey J H, Dirita V J. Activation of both *acfA* and *acfD* transcription by *Vibrio cholerae* ToxT requires binding to two centrally located DNA sites in an inverted repeat conformation[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4):1062 - 1077.
- [9] Chaparro A P, Ali S K, Klose K E. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors *AcfB* and *TcpI* contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 302(2):99 - 105.
- [10] Withey J H, Dirita V J. *Vibrio cholerae* ToxT independently activates the divergently transcribed *aldA* and *tagA* genes[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(23):7890 - 7900.
- [11] 程海燕,庞欢瑛,鲁义善,等.溶藻弧菌 *acfA* 基因克隆与生物信息学分析[J].广东海洋大学学报,2014,34(1):9 - 14.
- [12] Queen J, Satchell K J. Promotion of colonization and virulence by cholera toxin is dependent on neutrophils[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(9):3338 - 3345.
- [13] Peterson K M, Mekalanos J J. Characterization of the *vibrio cholerae* ToxR regulon; identification of novel genes involved in intestinal colonization[J]. Infection and Immunity, 1988, 56(11):2822 - 2829.
- [14] Cai S H, Huang Y C, Lu Y S, et al. Expression and immunogenicity analysis of accessory colonization factor A from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(2):454 - 462.
- [15] Sharma M K, Jani D, Thungapathra M, et al. Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B sub-

- unit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 135(1): 22–27.
- [16] Marrero K, Sánchez A, Rodríguez-Ulloa A, *et al.* Anaerobic growth promotes synthesis of colonization factors encoded at the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae* El Tor [J]. Research in Microbiology, 2009, 160(1): 48–56.
- [17] Liu X, She X T, Zhu Q F, *et al.* Heterogeneous interactome between *Litopenaeus vannamei* plasma proteins and *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 192–198.
- [18] 李传香, 薛淑霞, 刘逸尘, 等. 凡纳滨对虾泛素交联酶 E2 基因的克隆及表达分析 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 661–668.
- [19] 刘 祥, 李 惠. 大肠埃希菌外膜蛋白 OmpA 表达质粒构建和诱导条件优化 [J]. 生物技术, 2013, 23(4): 32–36.
- [20] Wang Y D, Peng K C, Wu J L, *et al.* Transgenic expression of salmon delta-5 and delta-6 desaturase in zebrafish muscle inhibits the growth of *Vibrio alginolyticus* and affects fish immunomodulatory activity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 223–230.
- [21] Lazo L, Izquierdo A, Suzarte E, *et al.* Evaluation in mice of the immunogenicity and protective efficacy of a tetra-valent subunit vaccine candidate against dengue virus [J]. Microbiology and Immunology, 2014, 58(4): 219–226.
- [22] Mire C E, Geisbert J B, Agans K N, *et al.* A recombinant Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects nonhuman primates against Hendra virus challenge [J]. Journal of Virology, 2014, 88(9): 4624–4631.
- [23] Xu M M, Sun Q, Su J, *et al.* Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(5): 440–444.
- [24] Corrales-Garcia L, Ortiz E, Castañeda-Delgado J, *et al.* Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis* [J]. Protein Expression and Purification, 2013, 89(1): 33–43.
- [25] Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(1): 207–234.