

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

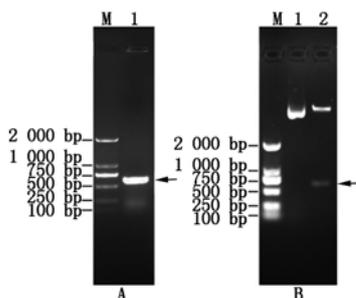
| 因子 Factor | 代号 Code | 水平 Level | | |
|---|------------|----------|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 加 IPTG 菌 OD ₆₀₀ 值 Strain OD ₆₀₀ value | e | 0.5 | 0.8 | 1 |
| IPTG 终浓度/(mmol/L) IPTG final concentration | f | 0.1 | 0.3 | 0.5 |
| 诱导时间/h Inducing time | g | 3 | 8 | 12 |
| 诱导温度/°C Inducing temperature | 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 μ L 的 2 \times SDS 蛋白上样缓冲液,沸水中煮样 5 min,取 10 μ L 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* DH5 α 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.

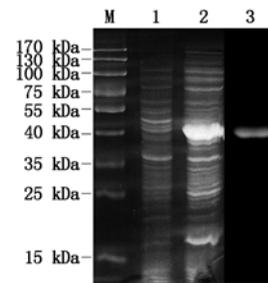
图 1 溶藻弧菌 *acfA* 基因重组质粒构建

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

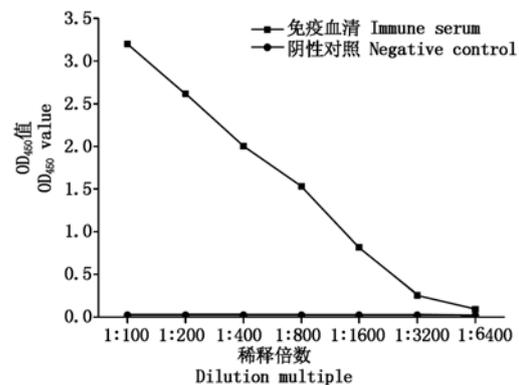
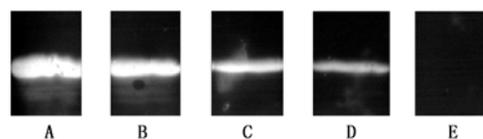


图 3 ACFA 多克隆抗体效价的测定

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。

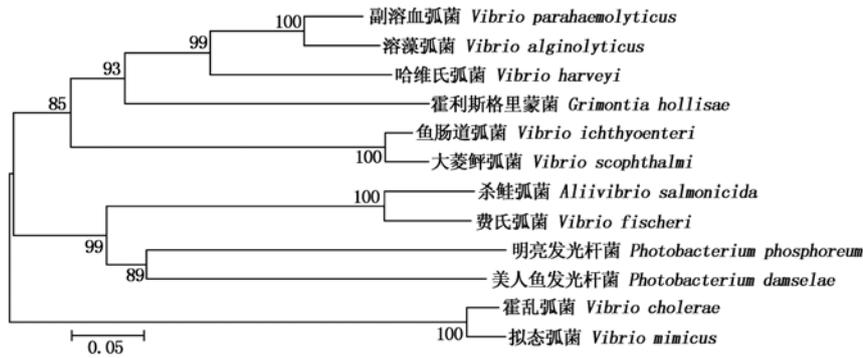


图 5 利用 MEGA 软件构建的 ACFA 氨基酸序列系统进化树

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 Mean value analysis | 因子 Factor | | |
|-----------------------------|-----------|-------|-------|
| | 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 | * |

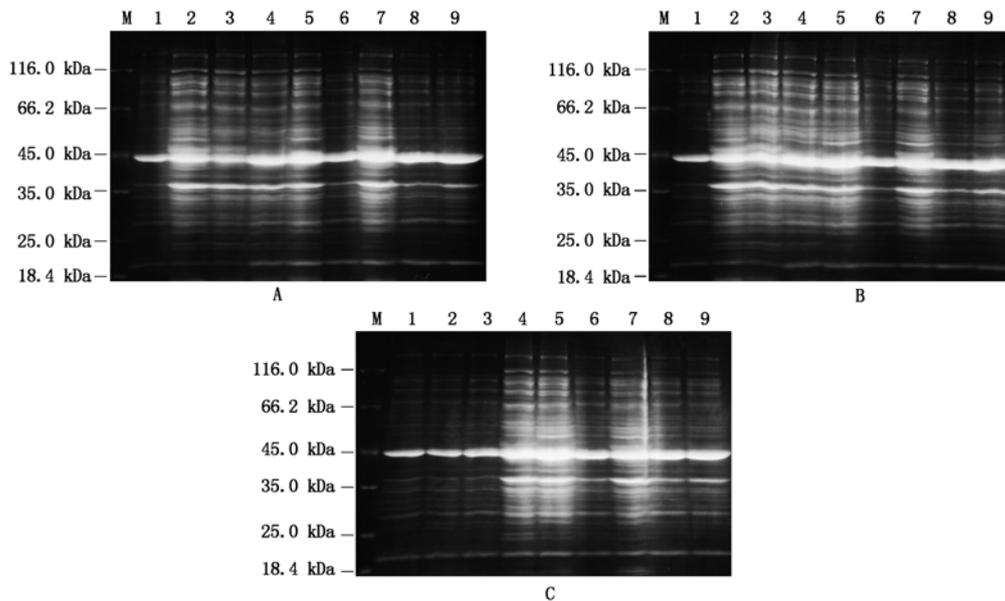
注: * P < 0.05, 与对照组相比存在差异。表 8 同。

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($\times 10^6$) Experimental group optical density value | | | 平均值($\times 10^6$) Average | 标准差($\times 10^6$) 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(×10 ⁶) | f(×10 ⁶) | g(×10 ⁶) | h(×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 | F 值 | 显著性 |
| | Mean square | F value | 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 °C。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: 在菌株对数生长中期加入低浓度 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.