

嗜水气单胞菌 Hcp 蛋白的原核表达·多克隆抗体制备及生物信息学分析

许艺兰¹, 许佳乐², 卢冰霞¹, 陈婷婷¹, 秦毅斌¹, 刘思雨², 全琛宇¹, 许心婷¹, 赵硕¹, 陈忠伟^{1*}, 何颖^{1*}

(1. 广西壮族自治区兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530002; 2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

摘要 [目的]获得嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AH) Hcp 蛋白的多克隆抗体(Polyclonal Antibody)及基本生物学特性。[方法]利用 RT-PCR 方法扩增 Hcp 基因, 构建重组表达质粒后转化 BL21 感受态细胞, 经 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷, Isopropyl β -D-Thiogalactoside)诱导表达获得 Hcp 重组蛋白, 纯化后免疫家兔, 制备针对该蛋白的多克隆抗体, 进行抗体的效价测定、Western blotting 鉴定, 利用生物信息学在线工具对其基本理化性质、保守结构域、磷酸化位点、二级与三级结构进行预测。[结果]该蛋白在 IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L、37 °C 下诱导表达 6 h 可获得最高表达量, 蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在; Western blotting 结果显示, AH 的培养物上清与沉淀均能够与制备的兔抗发生特异性结合, 具有良好的反应原性, 制备的多克隆抗体效价达 1.024×10^6 。生物信息学分析表明, 嗜水气单胞菌 Hcp 蛋白的分子式为 $C_{846}H_{1304}N_{224}O_{259}S_8$, 共编码 172 个氨基酸, 相对分子质量为 19 013.49 u, 等电点(PL)为 5.24, 属于稳定蛋白; 二级结构中无规则卷曲占比为 51.74%, 延伸链占比为 25.00%, α -螺旋占比为 19.19%, β -转角占比为 4.07%。[结论]成功制备了 Hcp 蛋白的多克隆抗体, 为进一步研究 AH 的 VI 型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)提供技术支持。

关键词 嗜水气单胞菌; Hcp 基因; 原核表达; 多克隆抗体制备; 生物信息学

中图分类号 S94 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2024)23-0079-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2024.23.018

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Prokaryotic Expression of Hcp Protein of *Aeromonas hydrophila*, Preparation of Polyclonal Antibody and Bioinformatics Analysis

XU Yi-lan¹, XU Jia-le², LU Bing-xia¹ et al (1. Guangxi Veterinary Research Institute/Key Laboratory of Veterinary Biotechnology of Guangxi, Nanning, Guangxi 530002; 2. Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] In order to obtain a polyclonal antibody to the Hcp protein of *Aeromonas hydrophila* (AH) and its basic biological properties. [Method] The present study utilized RT-PCR to amplify the Hcp gene, constructed a recombinant expression plasmid and then transformed the BL21 receptor cells, which were induced to express the Hcp recombinant protein through IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside), purified and immunized rabbits, and then prepared a polyclonal antibody against the protein. Hcp recombinant protein was obtained by IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside) induced expression, purified and immunized rabbits, and polyclonal antibody against the protein was prepared, and the potency of the antibody was determined, identified by Western blotting, and its basic physicochemical properties, conserved structural domains, and phosphorylation sites were investigated using bioinformatics online tools, secondary and tertiary structure prediction. [Result] The results showed that the highest expression of the protein was obtained at the final concentration of IPTG of 0.6 mmol/L at 37 °C for 6 h, and the protein mainly existed in the form of soluble protein; the results of Western blotting showed that the supernatant and precipitate of the culture of AH were able to specifically bind to the prepared rabbit antibody with good reactivity, and the potency of the prepared polyclonal antibody reached 1.024×10^6 . Bioinformatics analysis showed that the molecular formula of *Aeromonas hydrophila* Hcp protein was $C_{846}H_{1304}N_{224}O_{259}S_8$, encoding a total of 172 amino acids, with a relative molecular mass of 19 013.49 u, an isoelectric point (pI) of 5.24, which is a stabilized protein; the secondary structure of the protein was 51.74% of the irregularly coiled, 25.00% of the elongated chain, and 25.00% of the alpha-chain. 25.00%, α -helix accounted for 19.19%, and β -turns accounted for 4.07%. [Conclusion] In this study, a polyclonal antibody to Hcp protein was successfully prepared, which can provide technical support for the further study of Type VI secretion system (T6SS) of AH.

Key words *Aeromonas hydrophila*; Hcp gene; Prokaryotic expression; Preparation of polyclonal antibody; Bioinformatics

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, AH)是革兰氏阴性菌、弧菌科气单胞菌属,是一种普遍存在于各种水体、土壤中的条件性病原菌^[1],是构成养殖水环境中正常菌群种类之一,能够引起鱼类、动物和人的多种疾病^[2],如可诱发鱼类感染败血症^[3],为国内外水产养殖业带来巨大的经济损失^[4-5]。目前在水产养殖业中主要依靠抗生素抑制 AH 感染^[6],抗生素的滥用不仅会导致 AH 产生耐药性,还对生态环境与食品安全质量产生影响^[7],引起食品质量和生态安全问题^[8]。水产养殖中水生生物易受到 AH 的侵袭而产生疾病。虾的个体较小,逐一进行治疗不现实,而虾群在水体中也难以治疗。因此,控制该细菌在人群和水产养殖中的不断暴发

具有重要意义^[9]。

AH 的致病机制十分复杂,使宿主的疾病发生通常依靠分泌系统与毒力因子之间的相互作用。IV 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是 AH 的分泌系统之一^[10],由 13 个蛋白组成,负责将部分效应蛋白运传递到细胞外。溶血素共调节蛋白(hemolysin co-regulated protein, Hcp)是 T6SS 的蛋白质成分之一, Hcp 蛋白可以形成一个类似管状的六聚体,协助 T6SS 分泌毒力相关蛋白^[11-12]。Hcp 蛋白在 T6SS 系统中起着重要作用,既是其结构蛋白帮助形成注射装置分泌蛋白,又是其效应蛋白可以分泌到胞外增强毒力^[13]。笔者制备兔抗 Hcp 多克隆抗体,为深入开展 Hcp 的相关研究提供研究工具,还通过生物信息学软件分析其基本理化性质、结构等,为后续致病机制探究提供理论信息。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体 AH-SC-3 株, pET-32a(+) 载体由广西兽医生物技术重点实验室保存并提供。DH5 α 、BL21(DE3)

基金项目 广西重点研发计划项目(桂科 AB21076008, 桂科 AB20297059); 玉林市科学研究与技术开发计划项目(玉市科 20220519)。

作者简介 许艺兰(1996—),女,广西北流人,研究实习员,硕士,从事动物病原学研究。*通信作者:陈忠伟,正高级兽医师,从事动物病毒学研究;何颖,正高级兽医师,博士,从事兽医病理学和动物传染病学研究。

收稿日期 2024-01-15

感受态细胞购自上海昂羽生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器 限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Xho I*、T4 DNA Ligase 购自宝日医生物技术(北京)有限公司;质粒小量提取试剂盒购自 OMEGA 公司;His 标签蛋白纯化试剂盒、山羊抗兔 IgG(H+L)HRP 抗体购自康为生物技术有限公司;预染蛋白 Marker 购自 GenStar 公司。

1.3 引物的设计与合成 根据 *Hcp* 基因序列设计 *Hcp* 基因特异性引物,限制性酶切位点分别为 *EcoRI* 和 *Xho I*。Hep-F: 5'—3': CCGGAATTCATGCCAACTCCATGTTATAT; Hep-R: 5'—3': CGGCTCGAGTTACGCCTCGATCGGAGCAC。

1.4 *Hcp* 基因的扩增 以 AH-SC-3 的 DNA 为模板, Hep-F/R 为引物对进行 PCR 扩增,按照胶回收试剂盒操作说明对 PCR 产物进行胶回收。

1.5 原核表达质粒 pET-32a-Hcp 的构建 对目的基因 *Hcp* 的胶回收产物和 pET-32a(+)载体进行双酶切,再次胶回收,按照 T4 连接酶说明书对 2 个片段进行连接,将连接产物按照 DH5 α 感受态细胞使用说明转化至 DH5 α 感受态细胞。次日将单菌落扩繁后按照质粒抽提试剂盒操作说明提取质粒。对获得的质粒进行酶切鉴定并测序,命名为 pET-32a-Hcp。

1.6 重组 *Hcp* 蛋白的诱导表达及表达条件的优化 按照说明书将 pET-32a-Hcp 转化至 BL21 感受态细胞涂布于含氨苄抗性的 LA 平板,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12 h。挑取单菌落于 37 $^{\circ}$ C 150 r/min 培养 6 h,取部分菌液进行 PCR 鉴定,对鉴定正确的阳性克隆进行增菌培养。达到对数生长期后通过加入不同剂量的 IPTG 和改变诱导时间来确定最佳诱导条件。收集菌液 8 000 r/min 3 min 弃上清,加入 40 μ L PBS 重悬沉淀,并与 10 μ L loading buffer 混合,沸水浴 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 重组 *Hcp* 蛋白表达形式的鉴定及纯化 将表达的菌液进行超声裂解,裂解产物 4 000 r/min 10 min 分离上清和沉淀,将沉淀溶解于 Inclusion Body Elutio Buffer。将 40 μ L 的上清与沉淀溶解液与 10 μ L loading buffer 混合,沸水浴 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳。确定表达形式后进行大量诱导。根据纯化试剂盒中的方法纯化蛋白。

1.8 重组 *Hcp* 蛋白多克隆抗体的制备 按照表 1 所示的免疫程序,对家兔皮下进行多点注射。免疫结束后第 7 天进行心脏采血,收集血清(免疫前从兔耳缘静脉采血,分离血清作为阴性对照)。

表 1 免疫程序

Table 1 Immunization procedures

免疫次数 Immunization frequency	蛋白质量 Protein quality//mg	佐剂类型 Adjuvant type	间隔时间 Interval time//d
首免 First immunization	1.0	弗氏完全佐剂	
二免 Second immunization	0.5	弗氏不完全佐剂	14
三免 Third immunization	0.5	弗氏不完全佐剂	14
四免 Fourth immunization	0.5	弗氏不完全佐剂	

1.9 兔抗 *Hcp* 蛋白多克隆抗体效价的测定 测定方法参考

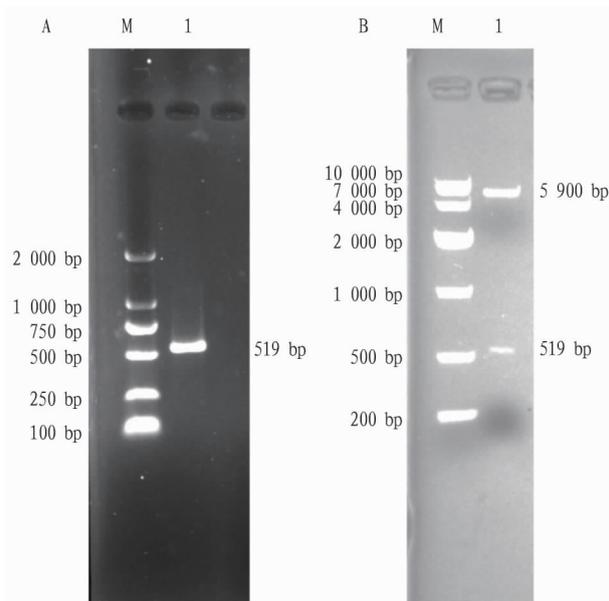
文献[14]。

1.10 兔抗 *Hcp* 蛋白多克隆抗体反应性的测定 收集 27 $^{\circ}$ C、150 r/min 过夜培养的嗜水气单胞培养物,分别以培养物上清与沉淀作为抗原,以 1:4 000 稀释的兔阳性血清和阴性血清为一抗,以 1:10 000 稀释的 HRP 山羊抗兔 IgG(H+L)为二抗进行 Western blotting,以判断该抗体的反应性。

1.11 *Hcp* 蛋白的生物信息学分析 使用在线生物信息学网站对 *Hcp* 蛋白的理化性质、结构等进行预测,具体为使用 ExPASy 数据库的 ProtParam 和 ProtScale 工具分析基本理化性质和亲疏水性,使用 SignalP 5.0、TMHMIM 2.0 分别对蛋白质进行信号肽分析、跨膜结构域分析。使用 NetPhos 3.1 和 NCBI 数据库的 CD-search 工具寻找蛋白质磷酸化位点和保守结构域。使用 SPOMA 和 SWISS-MODEL 分别预测蛋白质的二级结构和三级结构。

2 结果与分析

2.1 *Hcp* 基因的扩增及原核表达载体的构建 凝胶电泳结果显示,扩增结果得到 519 bp 目的片段(图 1A)。凝胶电泳结果显示,对 pET-32a-Hcp 进行双酶切,得到 519 bp 片段和 5 900 bp 片段,与预期相符(图 1B)。测序结果与参考序列的同源性为 100%。



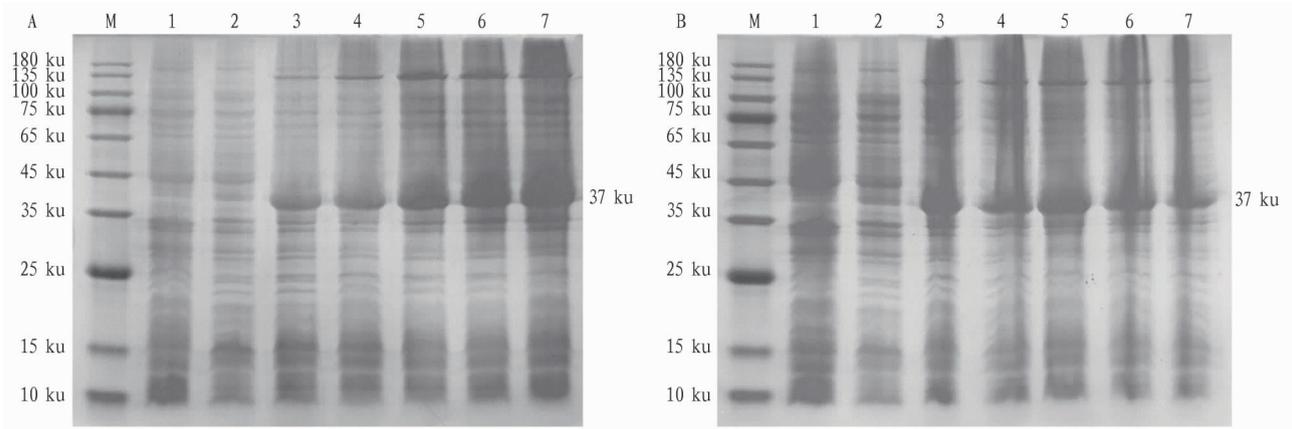
注:图 A. *Hcp* 基因扩增结果, M. DNA 分子量标准(DL 2 000), 1. *Hcp* 基因 PCR 扩增产物;图 B. pET-32a-Hcp 重组质粒双酶切鉴定, M. DNA 分子量标准(DL 10 000), 1. pET-32a-Hcp 重组质粒酶切产物。

Note: Figure A. *Hcp* gene amplification results, M. DNA molecular weight standard (DL 2 000), 1. *Hcp* gene PCR amplification product; Figure B. pET-32a-Hcp recombinant plasmid double enzyme digestion identification, M. DNA molecular weight standard (DL 10 000), 1. pET-32a-Hcp recombinant plasmid enzyme digestion product.

图 1 *Hcp* 基因扩增及 pET-32 a-Hcp 重组质粒双酶切结果

Fig. 1 Amplification of *Hcp* gene and double digestion results of pET-32a-Hcp recombinant plasmid

2.2 重组蛋白 Hcp 表达的条件优化 结果显示,表达的目的蛋白大小为 37 ku,与预期大小一致(图 2A、图 2B)。当诱导终浓度提高时,蛋白表达量提高(图 2A),而诱导时间延长时蛋白表达量无明显提升(图 2B)。

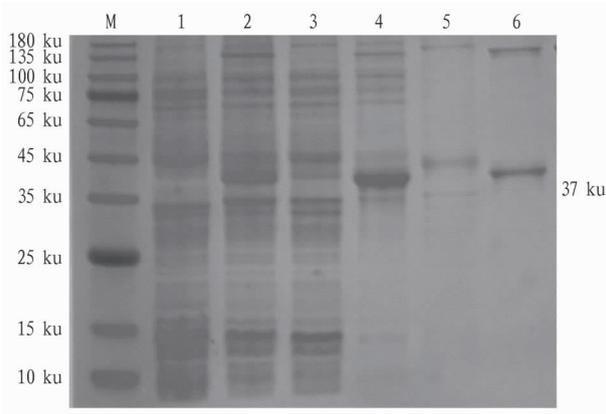


注:图 A. pET-32a-Hcp 蛋白最佳 IPTG 诱导浓度的摸索结果, M. 蛋白分子质量标准; 1. pET32a 空载体; 2. pET-32a-Hcp 未诱导; 3~7. IPTG 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 诱导的重组 Ah Hcp 蛋白。图 B. pET-32a-Hcp 蛋白最佳诱导时间的摸索结果, M. 蛋白分子质量标准; 1. p32a 空载体; 2. pET-32a-Hcp 未诱导; 3~7. 诱导时间分别为 2、4、6、8、10 h 诱导的重组 Ah Hcp 蛋白。

Note: Figure A. mapping results of optimal IPTG induction concentration of pET-32a-Hcp protein, M. protein molecular mass standard; 1. pET32a empty vector; 2. pET-32a-Hcp uninduced; 3~7. IPTG final concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L induced recombinant Ah Hcp protein. Figure B. results of mapping the optimal induction time of pET-32a-Hcp protein, M. protein molecular quality standard; 1. p32a empty vector; 2. pET-32a-Hcp uninduced; 3~7. recombinant Ah Hcp proteins induced by the induction time of 2, 4, 6, 8, 10 h, respectively.

图 2 pET-32a-Hcp 重组蛋白诱导表达条件的优化

Fig. 2 Optimization of induced expression conditions of pET-32a-Hcp recombinant protein



注: M. 蛋白分子质量标准; 1. pET-32a 空载体; 2. pET-32a-Hcp 诱导; 3. pET-32a-Hcp 未诱导; 4. pET-32a-Hcp 诱导破碎后上清; 5. pET-32a-Hcp 诱导破碎后沉淀; 6. pET-32a-Hcp 的表达纯化。

Note: M. Protein molecular quality standard; 1. pET-32a empty vector; 2. pET-32a-Hcp induced; 3. pET-32a-Hcp uninduced; 4. pET-32a-Hcp induced fragmentation and supernatant; 5. pET-32a-Hcp induced fragmentation and precipitation; 6. pET-32a-Hcp expression purification.

图 3 pET-32a-Hcp 重组蛋白的表达、纯化

Fig. 3 Expression and purification of pET-32a-Hcp recombinant protein

2.4 兔抗 AH-Hcp 蛋白多克隆抗体反应性 Western-blot 验证结果显示, AH 的培养物上清及沉淀与阳性一抗、二抗发

2.3 重组蛋白 Hcp 表达形式的鉴定及纯化 SDS 凝胶电泳结果表明, 重组蛋白 Hcp 在上清和沉淀中都存在(图 3), 如图 3 所示在上清中的表达量更高, 纯化后蛋白大小与预期结果一致。

生结合, 显色后条带大小约为 19 ku, 与预期结果一致(图 4A), 与阴性一抗反应未出现预期条带(图 4B)。

2.5 多克隆抗体效价的测定 经间接 ELISA 检测结果计算, 该研究制备的兔抗 Hcp 蛋白多克隆抗体血清平均效价为 1.024×10^6 (图 5)。

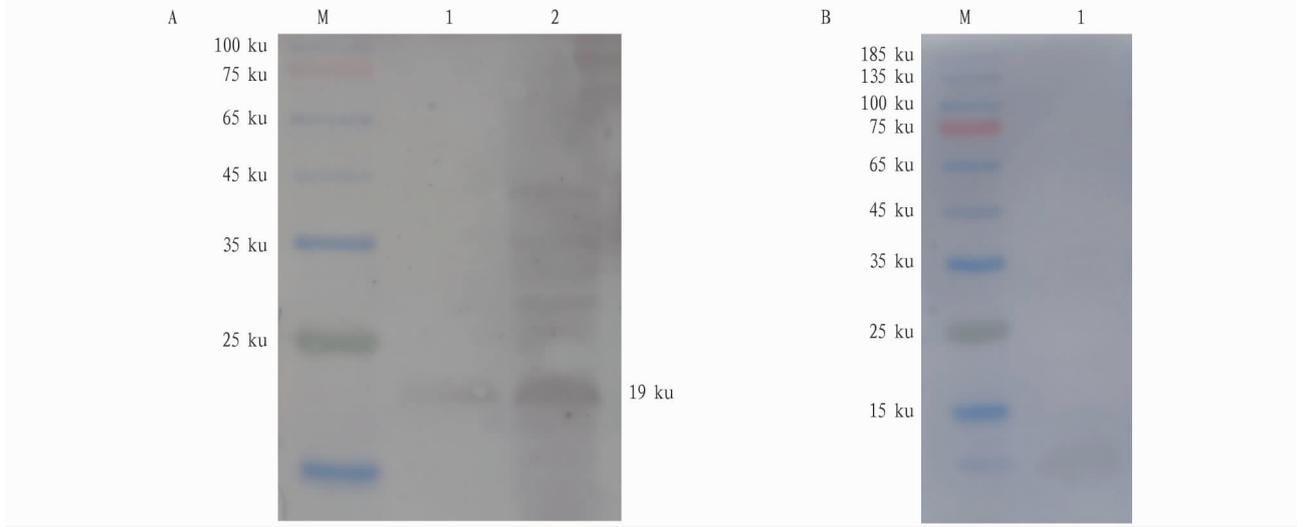
2.6 Hcp 蛋白基本理化性质 Hcp 蛋白由 172 个氨基酸组成, 数量最多的氨基酸为缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr), 均占 8.7%。蛋白分子式为 $C_{846}H_{1304}N_{224}O_{259}S_8$, 相对分子质量为 19 013.49, 理论等电点为 5.24。该蛋白携带的正电荷残基总数为 138, 负电荷残基总数为 20。蛋白总平均亲水性(GRAVY)为 -0.273, 属于亲水性蛋白, 第 117 号氨基酸的疏水性最强, 值为 1.433, 第 55 号氨基酸的亲水性最强, 值为 -1.911。蛋白质脂防系数为 73.66, 不稳定系数为 32.03, 为稳定蛋白。使用 ProtScale 分析 Hcp 蛋白的亲疏水性, 氨基酸分值 < 0 表明具有亲水性, 分值 > 0 表明具有疏水性。分析显示, Hcp 蛋白的大部分氨基酸位于亲水性区域, 是亲水性蛋白, 与蛋白质理化分析结果一致(图 6)。

2.7 Hcp 蛋白的信号肽和跨膜结构域预测 SignalP 5.0 分析(图 7)显示, Hcp 蛋白没有信号裂解位点, 推测 Hcp 蛋白不含信号肽, 属于非分泌蛋白。由 TMHMM 2.0 预测(图 8)显示, 该蛋白在跨膜区(transmembrane)和膜内区(inside)的概率极低, 在膜外区(outside)的概率接近于 1, 说明 Hcp 蛋白无跨膜结构域, 且整体位于膜外区。

2.8 Hcp 蛋白的磷酸化位点和保守结构域 使用

NetPhos 3.1 预测 Hcp 蛋白的磷酸化位点,当域值为 0.5 时,预测该蛋白共有 30 个磷酸化位点(图 9),包括 11 个丝氨酸(Serine),15 个苏氨酸(Threonine)和 4 个酪氨酸(Tyrosine)。

使用 NCBI 的 CD-search 工具预测 Hcp 蛋白含有 1 个保守结构域(图 10),属于 T6SS 分泌系统中 Hcp1 家族,为外膜通道蛋白家族。



注:图 A 中,M. 蛋白分子质量标准;1. AH 培养物上清;2. AH 培养物沉淀。图 B 中,M. 蛋白分子质量标准;1. AH 培养物沉淀。

Note: In Figure A, M. Protein molecular mass standard; 1. AH culture supernatant. 2. AH culture precipitate; In Figure B, M. Protein molecular mass standard; 1. AH culture precipitate.

图 4 重组蛋白 Hcp 的抗原性

Fig. 4 Antigenicity of recombinant protein Hcp

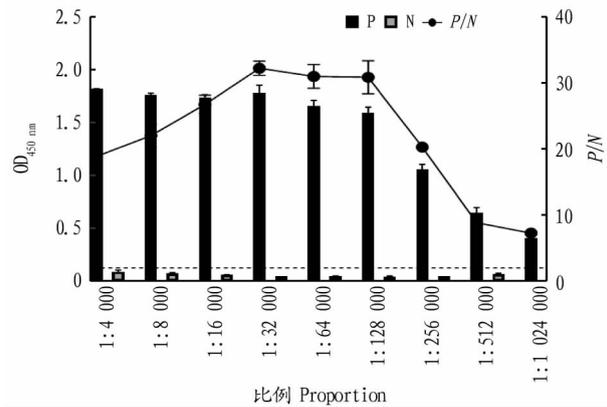


图 5 兔血清效价测定

Fig. 5 Rabbit serum potency assay

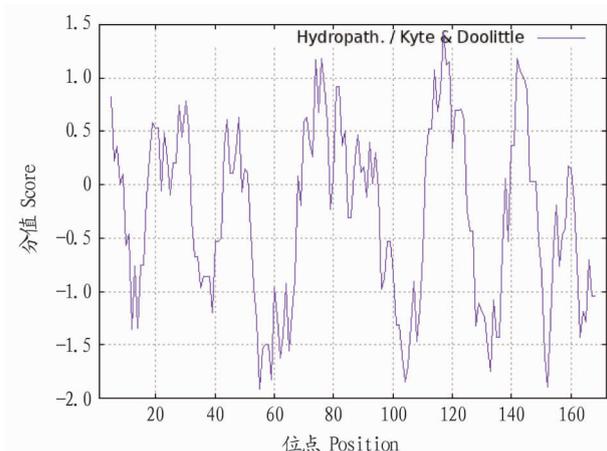


图 6 Hcp 蛋白亲疏水性分析

Fig. 6 Analysis of the hydrophilicity of Hcp proteins

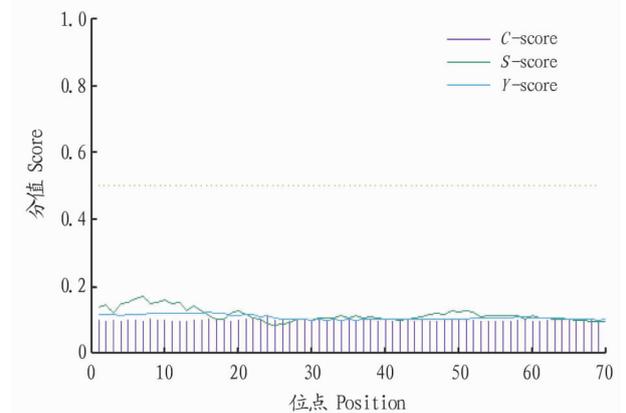


图 7 Hcp 蛋白信号肽预测

Fig. 7 Hcp protein signaling peptide prediction

2.9 Hcp 蛋白的二、三级结构 使用 SPOMA 软件对 Hcp 蛋白二级结构进行预测分析,该蛋白的构成主要是无规则卷曲(random coil),占 51.74%,延伸链(extended strand)占 25.00%, α -螺旋(alpha helix)占 19.19%, β -转角(beta turn)占 4.07%(图 11)。利用 SWISS-MODEL 预测的三级结构模型(图 12),预测得到全局模型质量估计(global model quality estimation, GMQE)值为 0.95,GMQE 值可以简单评估预测模型的质量,其值越接近 1,表明建模质量越好,表明预测结果可靠。

3 结论与讨论

T6SS 的内管由数百至数千个 Hcp 蛋白亚基组成六聚体^[15],形成一个管状结构。该研究中 Hcp 蛋白生物信息学分析表明,其由 172 个氨基酸组成,蛋白分子式为 $C_{846}H_{1304}N_{224}O_{259}S_8$,相对分子质量为 19 013.49 u,理论等电点

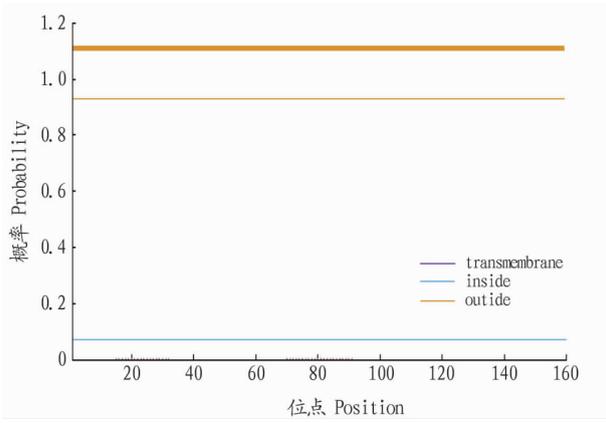
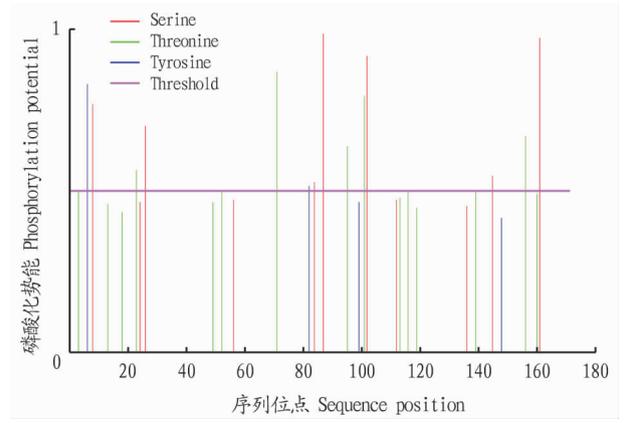


图 8 Hcp 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 8 Predicted transmembrane structural domains of Hcp proteins

为 5.24,属于亲水性蛋白,蛋白质脂肪系数为 73.66,不稳定系数为 32.03,为稳定蛋白。Hcp 蛋白没有信号裂解位点,属于非分泌蛋白,预测该蛋白共有 30 个磷酸化位点,包括 11 个丝氨酸,15 个苏氨酸和 4 个酪氨酸,含有 1 个保守结构域。



注:红色为丝氨酸磷酸化位点;绿色为苏氨酸磷酸化位点;蓝色为酪氨酸磷酸化位点;紫色线为阈值。

Note: Serine phosphorylation sites in red; threonine phosphorylation sites in green; tyrosine phosphorylation sites in blue; purple line is the broad value.

图 9 hcp 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 9 Predicted hcp protein phosphorylation sites

Protein Classification
Hcp family type VI secretion system effector (domain architecture ID 10022377)
 Hcp family type VI secretion system effector acts as a virulence factor, as a transporter of effectors and as a chaperone; it may aggregate into a needle-like shaft that can penetrate other bacteria via a puncturing protein attached to its head

Gene Ontology: GO:0033103 PubMed: 34061601

Graphical summary Zoom to residue level show extra options »

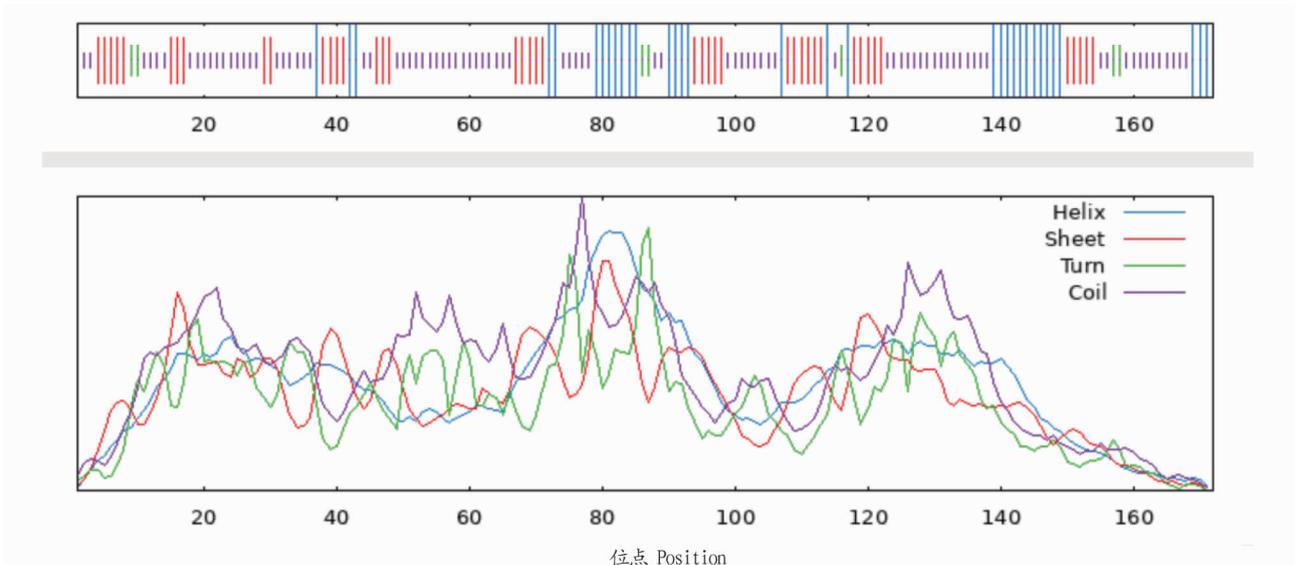
Query seq. MPTPCYI...
 Specific hits V_Secret_Hcp1
 Super-families T6SS_HCP super-family

List of domain hits

#	Name	Accession	Description	Interval	E-value
1	Vl_effect_Hcp1	TIGR03344	type VI secretion system effector, Hcp1 family; This family includes Hcp1 (hemolysin ...	2-169	3.80e-87

图 10 Hcp 蛋白保守结构域

Fig. 10 Conserved structural domains of Hcp proteins



注:蓝色区域代表α-螺旋,红色区域代表延伸链,绿色区域代表β-转角,紫色区域代表不规则卷曲。

Note: Blue areas represent α-helices, red areas represent extended chains, green areas represent β-turns, purple areas represent irregular coiling.

图 11 Hcp 蛋白二级结构预测

Fig. 11 Hcp protein secondary structure prediction



图12 Hcp蛋白三级结构预测

Fig.12 Predicted tertiary structure of Hcp protein

对 Hcp 蛋白二级结构进行预测分析,该蛋白的构成主要是无规则卷曲、延伸链、 α -螺旋、 β -转角。Hcp 作为效应蛋白的输出载体和伴侣,可以通过这些成分的共价延伸或通过非共价相互作用附着。因此,Hcp 蛋白也可以作为 T6SS 功能正常产生作用的标志。Wang 等^[16-17]用 Hcp 蛋白免疫了鲤鱼,与未接种的相比免疫了 Hcp 蛋白的鲤鱼存活率增加 7.14%。因此,该研究制备了 Hcp 蛋白多克隆抗体,以期待可以研究出针对 AH 的疫苗来对该细菌进行防控。

该研究使用 pET-32a(+) 系统表达重组蛋白^[18],这是目前应用最广、最成熟的表达系统之一^[19]。该质粒含有多个常用的酶切位点,便于不同基因克隆。此前有王楠楠等^[17]根据嗜水气单胞 NJ-35 株,利用 pET-28a(+) 表达载体构建重组质粒,表达重组 pET-28a-Hcp 蛋白,该蛋白大小为 24 ku,免疫家兔后效价达 1.28×10^4 。该研究根据实验室保存的 AH 基因组扩增了 Hcp 基因的完整序列,构建重组表达质粒 pET-32a-Hcp。使用 IPTG 诱导 Hcp 基因在宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 中能够大量稳定地表达。结果表明,重组蛋白 Hcp 同时在上清与沉淀中表达。由于可溶性表达的重组蛋白的生物学活性较高^[20],且上清中的表达量更高,故纯化上清中重组 Hcp 蛋白作为免疫原对家兔进行了免疫。ELISA 检测结果显示,抗体效价达到 1.024×10^6 ,说明表达的 Hcp 蛋白具有良好的免疫原性。经 Western blot 方法测定,该多抗具有较好的反应性,为深入开展 Hcp 的相关研究提供研究工具。

(上接第 74 页)

- [4] PAULI H, GOTTFRIED M, REITER K, et al. Signals of range expansions and contractions of vascular plants in the high Alps; Observations (1994–2004) at the GLORIA master site Schrankogel, Tyrol, Austria [J]. *Global change biology*, 2007, 13(1): 147–156.
- [5] 李灿, 刘贤安, 王娟, 等. 基于 MaxEnt 模型的四川省红豆杉潜在分布区分析及适宜性评价 [J]. *林业调查规划*, 2018, 43(1): 22–29.
- [6] 刘文胜, 游简龄, 曾文斌, 等. 气候变化下青藏高原草地地理分布的预测 [J]. *中国草地学报*, 2018, 40(5): 43–49.
- [7] 孙敬松, 周广胜. 利用最大熵法 (MaxEnt) 模拟中国冬小麦分布区的年代际动态变化 [J]. *中国农业气象*, 2012, 33(4): 481–487.
- [8] WU L, WANG M, OUYANG H, et al. Spatial distribution modelling of *Ko-*

参考文献

- [1] REN Y L, LI Y, HAN G, et al. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery [J]. *Chinese journal of biotechnology*, 2019, 35(5): 759–765.
- [2] WANG J B, YU M S, TSENG T T, et al. Molecular characterization of Ahp2, a lytic bacteriophage of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Viruses*, 2021, 13(3): 1–14.
- [3] HUANG D W, LIU H H, DAI N T, et al. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila* with catastrophic progression [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2021, 20(4): 379–383.
- [4] 罗晓松. 鱼源嗜水气单胞菌 aopB⁻ aopD⁻ aroA⁻ 缺失株构建及其生物学特性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [5] 陈召松, 吴焕青, 包婷端, 等. 基于文献计量分析的淡水鱼类寄生虫研究现状及热点探析 [J]. *水产科技情报*, 2022, 49(4): 235–244.
- [6] 张焕军, 王席席, 李轶. 水体中抗生素污染现状及其对氮转化过程的影响研究进展 [J]. *环境化学*, 2022, 41(4): 1168–1181.
- [7] LIU J, GAO S S, DONG Y H, et al. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila* [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 1–13.
- [8] POOLE T L, SCHLOSSER W D, ANDERSON R C, et al. Whole-genome sequence of *Aeromonas hydrophila* CVM861 isolated from diarrhetic neonatal swine [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1–9.
- [9] AWAN F, DONG Y H, WANG N N, et al. The fight for invincibility: Environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microb Pathog*, 2018, 116: 135–145.
- [10] HUANG Y M, DU P C, ZHAO M, et al. Functional characterization and conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio fluvialis* [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1–15.
- [11] WANG N N, LIU J, PANG M D, et al. Diverse roles of Hcp family proteins in the environmental fitness and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* Chinese epidemic strain NJ-35 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(16): 7083–7095.
- [12] 贝蕾. 哈维弧菌 T6SS 中 *rbsB*, *vgrG*, *hcp* 基因的表达及功能分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [13] WANG P, DONG J F, LI R Q, et al. Roles of the Hcp family proteins in the pathogenicity of *Salmonella typhimurium* 14028s [J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 1716–1726.
- [14] 秦毅斌, 刘磊, 卢冰霞, 等. 猪丁型冠状病毒重组 N 蛋白及其多克隆抗体的制备方法: CN201811572375. X [P]. 2019–04–19.
- [15] MOUGOUS J D, CUFF M E, RAUNSER S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus [J]. *Science*, 2006, 312(5779): 1526–1530.
- [16] WANG N N, WU Y F, PANG M D, et al. Protective efficacy of recombinant hemolysin co-regulated protein (Hcp) of *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46(2): 297–304.
- [17] 王楠楠. 嗜水气单胞菌 VI 型分泌系统效应分子 Hcp 的功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [18] BUSUTTIL B E, TURNEY K L, FRAUMAN A G. The expression of soluble, full-length, recombinant human TSH receptor in a prokaryotic system [J]. *Protein Expr Purif*, 2001, 23(3): 369–373.
- [19] KANG Y, SON M S, HOANG T T. One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system [J]. *Protein Expr Purif*, 2007, 55(2): 325–333.
- [20] 姜媛媛, 刘铭瑶, 任桂萍, 等. 高效可溶性重组蛋白表达载体的构建 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26(1): 121–129.

bresia pygmaea (Cyperaceae) on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Journal of resources and ecology*, 2017, 8(1): 20–29.

- [9] 李旭谦. 青海湖流域草地类型及其分布 [J]. *青海草业*, 2009, 18(4): 20–23, 19.
- [10] ZHANG X Q, REN Y, YIN Z Y, et al. Spatial and temporal variation patterns of reference evapotranspiration across the Qinghai-Tibetan Plateau during 1971–2004 [J]. *Journal of geophysical research*, 2009, 114: 1–14.
- [11] XU X K, CHEN H, LEVY J K. Spatiotemporal vegetation cover variations in the Qinghai-Tibet Plateau under global climate change [J]. *Chinese science bulletin*, 2008, 53(6): 915–922.
- [12] 胡忠俊, 张德铨, 于海彬. 基于 MaxEnt 模型和 GIS 的青藏高原紫花针茅分布格局模拟 [J]. *应用生态学报*, 2015, 26(2): 505–511.