

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01092

# 铜绿假单胞菌外膜蛋白 H 原核表达、多克隆抗体制备及免疫保护作用

刘 祥\*

陕西理工学院生物科学与工程学院生物化学与分子生物学教研室, 汉中 723001

**[摘要]** **目的** 为铜绿假单胞菌外膜蛋白 H(OprH)工业发酵与疫苗开发研究奠定基础。**方法** 采用分子克隆技术构建 OprH 蛋白的表达菌株,通过正交试验设计筛选 OprH 菌株的最佳培养条件与表达条件。利用切胶纯化获得 OprH 蛋白并免疫小鼠,制备 OprH 蛋白多克隆抗体,采用 ELISA 法检测抗体滴度,蛋白质印迹法检测抗血清特异性;对小鼠免疫 OprH 蛋白,攻毒铜绿假单胞菌,检测蛋白的免疫保护作用。**结果** OprH 重组载体双酶切、DNA 测序鉴定结果,以及蛋白表达、纯化条带大小与预测一致。OprH 菌株最佳培养条件为转速 230 r/min,葡萄糖浓度 0%,装液量 50 mL;最佳诱导表达条件为异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷终浓度 0.3 mmol/L,诱导时菌液  $D_{600}$  值 0.8,温度 32°C,诱导时间 3 h。ELISA 法获得 OprH 抗血清滴度达 1 : 1 600,蛋白质印迹法证实抗血清具有很好的特异性。OprH 免疫小鼠激活的特异性免疫对小鼠铜绿假单胞菌感染的保护率达到 46.15%,与对照相比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 成功构建 OprH 表达载体,纯化获得 OprH 蛋白,制备 OprH 蛋白多克隆抗体,实验结果表明 OprH 蛋白对小鼠铜绿假单胞菌感染具有免疫保护作用,并获得 OprH 蛋白菌株的最佳培养条件与表达条件。

**[关键词]** 铜绿假单胞菌;外膜蛋白 H;正交试验;多克隆抗体

**[中图分类号]** Q 81; R 349.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)10-1092-05

## Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and immunoprotection potential of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH

LIU Xiang\*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To lay a foundation for the industrial fermentation and vaccine development of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) outer membrane protein OprH. **Methods** The OprH expression strain was obtained by molecular cloning. The culture condition and optimal expression of the experiment was obtained by the method of orthogonal design. OprH was purified by gel slice strategy and was used to immunize mice to prepare the polyclonal antibody. The antibody titer and specificity were detected by ELISA and Western blotting analysis, respectively. Mice were immunized by OprH protein and infected with *P. aeruginosa*, and the immune protection of OprH was detected. **Results** OprH recombinant vector were digested and sequenced, and the results confirmed the correct construction; and OprH expression and purification of strip size agreed with the prediction. The optimal culture condition was as follows: rotation rate was 230 r/min, glucose concentration was 0%, and the medium volume was 50 mL. The optimal inducing expression condition of OprH was as follows: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside final concentration was 0.3 mmol/L, strain  $D_{600}$  value was 0.8, inducing temperature was 32°C, and inducing time was 3 h. The OprH antibody titer was 1 : 1 600 as detected by ELISA, and Western blotting analysis proved that the antiserum had good specificity. Mice specific immune was activated by OprH, and immune protection rate for mice against *P. aeruginosa* infection was 46.15%, which had significant differences compared with the control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** We have successfully cloned OprH expression vector, purified OprH, prepared the polyclonal antibodies of OprH. It is confirmed that OprH protein has significant immune protection against *P. aeruginosa*, and the culture and induction conditions of the recombinant OprH have been obtained.

**[Key words]** *Pseudomonas aeruginosa*; outer membrane OprH protein; orthogonal test; polyclonal antibodies

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(10):1092-1096]

**[收稿日期]** 2015-03-01 **[接受日期]** 2015-07-03

**[基金项目]** 陕西省教育厅科学研究计划(2013JK0723)。Supported by Science Research Project of Education Department of Shaanxi Province (2013JK0723)。

**[作者简介]** 刘 祥, 博士, 讲师。

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0916-2642943, E-mail: liuxiang888525@163.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 又称绿脓杆菌, 是一种条件致病菌, 在正常人的皮肤、呼吸道和肠道等均有此菌存在, 是医院内感染的主要病原菌之一。当机体抵抗力下降、重大疾病创伤、免疫缺陷以及烧伤后极易诱发感染, 严重时可导致威胁生命的感染性休克<sup>[1]</sup>。目前, 该菌感染的治疗方法主要采用抗生素, 但存在耐药性不断提高的问题, 因此, 人们一直在寻找有效的防治对策<sup>[2]</sup>。已知的铜绿假单胞菌外膜蛋白(outer membrane protein, Opr)有 20 多种, 其中免疫原性高的有 OprH、OprF 和 OprI 3 种。OprH 具有由 8 个  $\beta$  片层组成的跨膜桶状结构和 4 个大小不等的胞外环, 与脂多糖存在直接的相互作用, 并与细菌外膜的稳定性和抗生素耐药性相关<sup>[3]</sup>。OprH 免疫兔产生的抗体可与不同菌株的铜绿假单胞菌发生特异性的凝集反应, 表明其可能是一种重要的免疫保护抗原, 在疫苗研发上有很好的应用前景<sup>[4-6]</sup>。

本实验通过获得铜绿假单胞菌 OprH 蛋白的重组高表达菌株, 纯化 OprH 蛋白, 制备小鼠 OprH 抗血清, 然后对小鼠免疫 OprH 蛋白, 攻毒铜绿假单胞菌, 考察 OprH 的免疫保护功能。并采用正交试验筛选 OprH 最适的培养与诱导表达条件, 为 OprH 工业化生产、蛋白亚单位疫苗研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 铜绿假单胞菌 PAO1、*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株、*E. coli* BL21、pET-32a 质粒均由陕西理工学院生化与分子菌种中心保存; 引物、基因测序由北京鼎国生物技术有限公司完成; 昆明小鼠由西安交通大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(陕)2010-001; *Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 与 *Xho* I、DNA Marker 与 Protein Marker 购于大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于西安沃尔森生物技术有限公司; 酵母提取物、蛋白胨以及异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)购于美国 MP 公司。

1.2 OprH 重组菌株的构建 依据 NCBI 公布的铜绿假单胞菌 PAO1 *OprH* 基因序列, 使用 Primer 软件设计引物。引物 1: 5'-ACA GGA TCC ATG AAA GCA CTC AAG ACT-3', 引物 2: 5'-ACT CTC GAG TTA GAA CTT GTA GTT GGC-3', 下划线为内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 的酶切位点。PCR 反应

体系及条件与作者前期研究<sup>[7-8]</sup>一致。将 PCR 产物与 pET-32a 质粒双酶切, 经连接酶连接后, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株, 构建重组 OprH 克隆菌株。培养重组菌株, 提取获得重组质粒, 再经过双酶切及序列测序检测后, 转化 *E. coli* BL21 菌株, 最终获得 OprH 表达菌株。

1.3 OprH 蛋白的表达鉴定与纯化 于培养皿中选取重组子培养 16 h, 转接培养至  $D_{600}$  约 0.8 h, 加入适量的 IPTG 诱导, 培养 7 h 后, 将获得的菌体进行蛋白电泳检测。待检测正确表达后, 大量培养 OprH 菌株, 超声破碎细菌, 结合蛋白电泳切胶的方法, 按照作者前期研究的方法<sup>[8]</sup>对 OprH 蛋白进行纯化。

1.4 OprH 蛋白原核表达条件的筛选 利用 L9 (34) 正交试验设计方法<sup>[9]</sup>, 筛选 OprH 最适培养条件与诱导表达条件。OprH 菌株培养条件正交试验主要步骤为: 取单菌落入 LB 培养液中, 培养 16 h 后, 以 1:100 转接菌体入含 LB 培养基的 250 mL 培养瓶中, 并按照正交试验设计的要求对菌体进行培养, 记录获得的菌液  $D_{600}$  值<sup>[10]</sup>。OprH 菌株诱导表达条件正交试验主要步骤为: 依据 OprF 菌株的最适培养条件<sup>[11]</sup>, 培养菌液浓度至不同  $D_{600}$  值, 再按照正交试验模型的要求, 加入不同浓度的 IPTG 诱导, 收集沉淀加入适量的蛋白上样缓冲液, 并加样 10  $\mu$ L 进行蛋白电泳检测。最后, 将获得的电泳图谱经 Phoretix 1D 软件分析 OprH 蛋白  $D$  值。

1.5 小鼠 OprH 多克隆抗体制备 选取健康的 5 周龄雌性昆明小鼠 15 只, 按照作者前期研究的方法<sup>[8]</sup>进行 OprH 蛋白的小鼠免疫。每只小鼠每次免疫 50  $\mu$ g, 共免疫 3 次。最后眼部取血获得 OprH 抗血清。

1.6 ELISA 和蛋白质印迹法检测 OprH 抗血清效价与特异性 将纯化的 OprH 蛋白溶解至 5  $\mu$ g/ $\mu$ L, 在对应的 96 孔板中加入 100  $\mu$ L 作为抗原, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h; 倒空液体, PBS 洗涤, 加入适量的封闭液, 充分孵育 2 h; 然后, 每孔加 100  $\mu$ L 不同稀释度的 OprH 抗血清, 室温孵育 1 h, 洗涤后加入 100  $\mu$ L 二抗 (1:3 000), 室温孵育 1 h。最后, 显色液显色 10 min 后, 加入终止液终止显色, 450 nm 处读取  $D$  值<sup>[12]</sup>。

通过蛋白质印迹法<sup>[7]</sup>检测 OprH 抗血清特异性, 步骤为: 将 OprH 表达菌株进行 SDS-PAGE, 转 NC 膜, 封闭液封闭后, 于 OprH 抗血清中孵育, 并加入二抗, 最后 DAB 显色。

1.7 重组 OprH 蛋白对小鼠的免疫保护实验 实

实验组和对照组各选用 15 只雄性昆明小鼠,按照作者前期研究的方法<sup>[8]</sup>进行免疫。第 3 次免疫 7 d 后,以  $1.0 \times 10^7$  CFU 单位的铜绿假单胞菌进行小鼠腹腔攻毒实验,记录小鼠的死亡情况。依据公式:保护率(%) =  $(1 - \text{实验组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ ,计算 OprH 蛋白的免疫保护作用<sup>[13]</sup>。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,菌株培养条件与蛋白诱导表达图谱的光密度值正交实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 OprH 重组质粒的构建 以提取的铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。图 1A 中显示 PCR 获得与预期大小一致的目的基因片段。将 PCR 获得的 *OprH* 基因连接入 pET-32a 质粒,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株;提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒获得 603 bp 片段(图 1B),与 *OprH* 基因大小一致。重组基因的序列测定结果与 NCBI 公布的 *OprH* 基因相同。

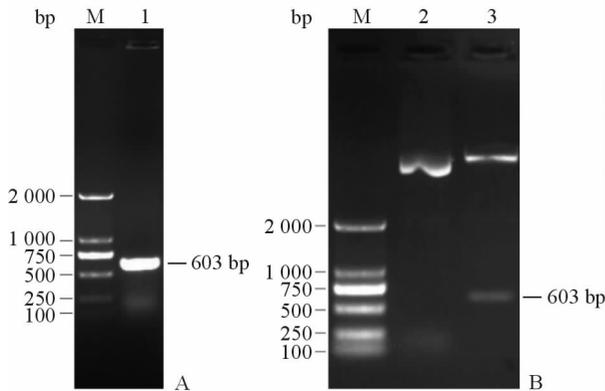


图 1 铜绿假单胞菌 OprH 重组质粒构建  
Fig 1 Construction of recombinant plasmid of *P. aeruginosa* OprH gene

A: *OprH* gene by PCR; B: OprH recombinant plasmid testing. OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; M: DNA marker; 1: *OprH* gene 2: Recombinant plasmid of *OprH* gene; 3: OprH recombinant plasmid digested with *Bam*H I and *Xho* I

2.2 OprH 蛋白的表达鉴定与纯化 重组表达菌株经 IPTG 诱导后,获得大小为 42 000 的条带: OprH (21 574), pET-32a 质粒蛋白标签(20 400)。OprH 重组蛋白的表达结果与预期一致,并通过蛋白电泳切胶纯化获得 OprH 重组蛋白(图 2)。

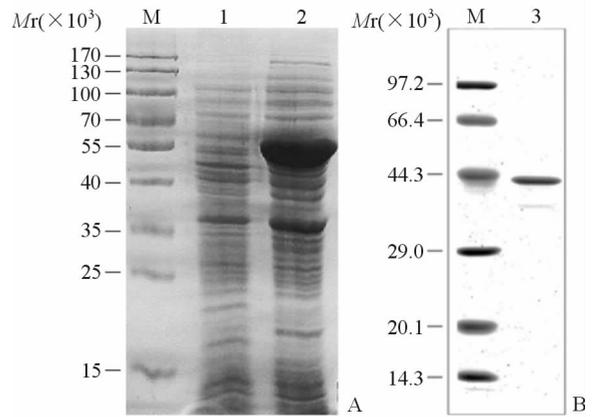


图 2 铜绿假单胞菌 OprH 蛋白表达(A)与纯化(B)  
Fig 2 Expression (A) and purification (B) of *P. aeruginosa* OprH protein

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside. M: Protein marker; 1: Not induced; 2: IPTG induced; 3: OprH protein purification

### 2.3 OprH 蛋白表达条件的优化

2.3.1 OprH 表达菌株最适培养条件 依据 L9 (34) 正交实验设计,获得 OprH 表达菌株培养条件的实验结果见表 1。结果可知各因素对培养条件的影响程度依次为 C>A>B,葡萄糖浓度、转速及装液量因子对培养条件的影响均具有统计学意义 ( $F=26.404, P<0.01; F=10.512, P<0.01; F=70.916, P<0.01$ )。通过比较表 1 中获得的 K1、K2 和 K3 各个试验组合,获得 OprH 表达菌株最佳培养条件为组合 A1B3C1,即培养液中葡萄糖浓度为 0,转速 230 r/min,装液量 50 mL。

2.3.2 OprH 表达菌株诱导条件 通过正交试验设计,结合 SDS-PAGE 蛋白电泳检测 OprH 的表达情况,3 次重复,获得 OprH 蛋白表达图谱;然后利用 Phoretix 1D 软件分析蛋白条带,获得 OprH 蛋白条带的光密度值实验结果(表 2)。结果可知各因素对 OprH 表达的影响程度依次为 H>G>E>F;菌液浓度、IPTG 诱导终浓度、诱导温度及诱导时间 4 个因素对 OprH 表达的影响均具有统计学意义 ( $F=72.354, P<0.01; F=40.721, P<0.01; F=79.707, P<0.01; F=229.273, P<0.01$ )。

通过比较表 2 中获得的 K1、K2 和 K3 各个试验组合,获得 OprH 最佳诱导表达条件为 E2F2G1H2,即菌液  $D_{600}$  值 0.8, IPTG 诱导终浓度为 0.3 mmol/L,诱导时间 3 h,诱导温度 32 $^{\circ}$ C。

表 1 铜绿假单胞菌 OprH 重组菌株培养条件试验

Tab 1 Culturing condition of *P. aeruginosa*

OprH recombinant strain

Number	A (%)	B (r · min <sup>-1</sup> )	C V/mL	D <sub>600</sub> value $\bar{x} \pm s$
1	0	180	50	1.885 ± 0.010
2	0	200	75	1.731 ± 0.019
3	0	230	100	1.769 ± 0.006
4	0.4	180	75	1.692 ± 0.007
5	0.4	200	100	1.719 ± 0.013
6	0.4	230	50	1.844 ± 0.004
7	1	180	100	1.630 ± 0.008
8	1	200	50	1.766 ± 0.003
9	1	230	75	1.736 ± 0.005
K1	1.795	1.736	1.832	
K2	1.752	1.739	1.720	
K3	1.711	1.783	1.706	
R	0.084	0.047	0.126	

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. A: Glucose concentration; B: Rotation rate; C: Medium volume

表 2 铜绿假单胞菌 OprH 表达诱导条件

Tab 2 Inducing condition of

*P. aeruginosa* OprH expression

Number	E	F c <sub>B</sub> /mmol · L <sup>-1</sup>	G t/h	H θ/°C	OprH expression (×10 <sup>4</sup> ), $\bar{x} \pm s$
1	0.5	0.1	3	28	1.581 ± 0.081
2	0.5	0.3	8	32	3.869 ± 0.044
3	0.5	0.5	12	37	4.249 ± 0.268
4	0.8	0.1	8	37	3.932 ± 0.279
5	0.8	0.3	12	28	3.600 ± 0.228
6	0.8	0.5	3	32	6.799 ± 0.436
7	1	0.1	12	32	3.566 ± 0.591
8	1	0.3	3	37	5.587 ± 0.128
9	1	0.5	8	28	0.541 ± 0.086
K1	3.238	3.026	4.659	1.911	
K2	4.781	4.353	2.784	4.740	
K3	3.225	3.865	3.801	4.593	
R	1.556	1.327	1.875	2.829	

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactoside. E: Strain D<sub>600</sub> value; F: IPTG final concentration; G: Inducing time; H: Inducing temperature

表 3 小鼠免疫铜绿假单胞菌 OprH 及攻毒铜绿假单胞菌致病菌

Tab 3 Immunity of *P. aeruginosa* OprH and challenging *P. aeruginosa* pathogenic bacteria in mice

Group	Death of mice after toxin attack <i>n</i>				Alive <i>n</i>	Death rate (%)	Protective rate (%)
	0-48 h	48-96 h	96-120 h	120-360 h			
Control	8	4	1	0	2	86.67	-
OprH	4	2	1	0	8	46.67	46.15*

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*. \* *P* < 0.05 vs control group

2.4 OprH 抗血清效价与特异性鉴定 通过酶联法发现 OprH 抗血清效价达 1 : 1 600(图 3)。利用蛋白质印迹法,发现不同稀释度的 OprH 抗血清均有对应的条带出现,而对照未检测到相应的条带(图 4)。证明获得的重组 OprH 蛋白抗血清与 OprH 蛋白可以特异性地结合。

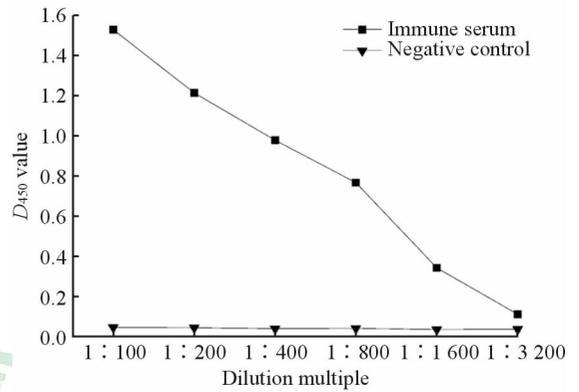


图 3 铜绿假单胞菌 OprH 抗血清效价的鉴定

Fig 3 Identification of *P. aeruginosa* OprH antiserum titer

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*

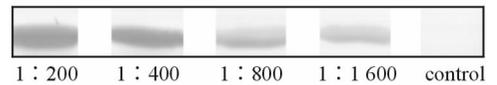


图 4 铜绿假单胞菌 OprH 抗血清特异性的蛋白质印迹法检测

Fig 4 Identification of the specificity of *P. aeruginosa* OprH antiserum by Western blotting analysis

OprH: Outer membrane protein H; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*

2.5 OprH 蛋白的免疫保护效果 小鼠经 3 次 OprH 蛋白免疫后,攻毒绿脓杆菌致病菌,发现 48 h 内小鼠死亡率最高,且活动呆滞、毛发蓬松、拒绝进食;4 d 后,小鼠死亡率明显下降。结果显示,OprH 免疫小鼠激活的特异性免疫对小鼠绿脓杆菌感染的保护率达到 46.15%,与对照组相比较差异具有统计学意义(*P* < 0.05,表 3)。

*N* = 15

### 3 讨论

OprH 是铜绿假单胞菌的主要外膜蛋白,具有很强的免疫原性<sup>[4]</sup>,研究发现铜绿假单胞菌感染患者中 OprH 抗血清具有普遍性<sup>[14]</sup>,有人还将 OprH 和 OprF 构建融合蛋白,获得的抗血清可与不同种类铜绿假单胞菌发生特异性的凝集反应,为疫苗研究奠定基础<sup>[5]</sup>。本实验对小鼠免疫 OprH 蛋白,小鼠在饮食、精神状态上也无较大变化,表明重组蛋白对小鼠的毒害作用很小。制备的 OprH 小鼠多克隆抗体效价达到 1 : 1 600,效价偏低,可能是采用小鼠免疫获得的抗血清缘故<sup>[10]</sup>。实验也证实 OprH 蛋白对小鼠铜绿假单胞菌感染具有免疫保护作用,为 OprH 蛋白免疫学功能研究提供依据。

鉴于 OprH 重要的免疫学功能,有必要通过基因工程手段获得高表达的工程菌株<sup>[15-16]</sup>。本研究采用正交试验设计方法,进行铜绿假单胞菌 OprH 蛋白的原核表达研究,结果证实 OprH 表达菌株最佳培养条件为:培养液无需添加葡萄糖,转速 230 r/min,装液量 50 mL;最佳 OprH 蛋白诱导条件为:加 IPTG 菌液  $D_{600}$  值 0.8, IPTG 诱导终浓度 0.3 mmol/L,诱导时间 3 h,诱导温度 32℃。有实验发现提高培养液转速可促进氧气与营养的供给,利于菌体的生长<sup>[9, 17]</sup>,本实验也认为提高培养液的转速利于菌体生长。有研究发现长时间诱导可抑制目的蛋白产物的生成,且长时间诱导提高生产成本,因而实际生产中需要采用合适的诱导时间<sup>[18]</sup>。IPTG 有细胞毒性,不利于菌体蛋白表达,生产中应采用低浓度 IPTG 诱导。低温诱导利于活性蛋白形成,也利于包涵体的形成<sup>[9]</sup>,与本研究结果一致,生产中应采用低温诱导。因而, OprH 工程菌蛋白发酵可按两步法进行:(1) IPTG 诱导前,尽量增加培养液的转速,从而提高菌体生长的速度;(2) IPTG 诱导时,选取菌体对数生长期诱导,低温、低浓度 IPTG 诱导,且选择适当的诱导时间。

#### [参考文献]

[1] 邵圣文,杨红霞,徐伯赢,张建国,张慧,陈亮. 铜绿假单胞菌生物膜致豚鼠下呼吸道感染分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26: 1388-1389.

[2] Krylov V N. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy[J]. Adv Virus Res, 2014, 88: 227-278.

[3] Edrington T C, Kintz E, Goldberg J B, Tamm L K. Structural basis for the interaction of lipopolysaccharide with outer membrane protein H (OprH) from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Biol Chem, 2011, 286:

39211-39223.

- [4] Michelim L, Medeiros G S, Zavascki A P. Current status of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 14: 951-959.
- [5] 徐波,曹郁生,陈燕,郭兴华. 乳酸乳球菌食品级诱导表达系统的构建及异源蛋白的表达[J]. 微生物学报, 2007, 47: 604-609.
- [6] Soldatenkova A V, Geiderova L A, Akhmatova N K, Mikhailova N A. [*Pseudomonas aeruginosa* recombinant proteins: effect on mice cytokine profile][J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2013, 6: 80-87.
- [7] 刘祥,陈春琳,牟欢,吴三桥,张涛,张晓娟. 重组人骨硬化蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. 生物技术, 2014, 24: 68-72.
- [8] 刘祥,陈春琳,王杨科,俱雄,吴三桥,张涛. 小鼠骨桥蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42: 1069-1075.
- [9] 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: 32-36.
- [10] 刘祥. 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[J]. 华北农学报, 2015, 30: 35-41.
- [11] 刘祥. 铜绿假单胞菌外膜蛋白 F 原核载体构建、表达条件优化及免疫保护作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25: 12-16.
- [12] 刘祥. 福氏志贺菌 2 型外膜蛋白 A 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 动物医学进展, 2015, 36: 6-10.
- [13] 俱雄,陈春琳,刘祥,张涛,吴三桥,张晓娟. 大肠埃希菌外膜蛋白 OmpC 的原核表达与免疫保护作用研究[J]. 生命科学研究, 2015, 19: 131-136.
- [14] Montor W R, Huang J, Hu Y, Hainsworth E, Lynch S, Kronish J W, et al. Genome-wide study of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays[J]. Infect Immun, 2009, 77: 4877-4886.
- [15] 刘祥. 小鼠骨形成蛋白 BMP3 的原核表达及多克隆抗体制备与鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30: 8-13.
- [16] 刘祥,俱雄,陈春琳. 重组大肠埃希菌外膜蛋白 OmpT 的载体构建和表达条件优化及多克隆抗体制备[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41: 350-355.
- [17] Xu M, Sun Q, Su J, Wang J F, Xu C, Zhang T, et al. Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans* [J]. Enzyme Microb Tech, 2008, 42: 440-444.
- [18] Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41: 207-234.