

程世前, 康竞艺, 陈萌轩, 等. 猪传染性胸膜肺炎疫苗抗原 Apx II 在谷氨酸棒杆菌中的表达及发酵条件优化[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2310-2316.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.014

猪传染性胸膜肺炎疫苗抗原 Apx II 在谷氨酸棒杆菌中的表达及发酵条件优化

程世前¹, 康竞艺¹, 陈萌轩¹, 刘秀霞^{1,2,3}, 杨艳坤^{1,2,3}, 白仲虎^{1,2,3}

(1. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 猪胸膜肺炎放线杆菌是一种高度传染性、致死性呼吸道疾病, 已造成养猪业严重损失。细胞毒素 Apx II 是猪胸膜肺炎 PCP (Porcine contagious pleuropneumonia) 的主要抗原之一, 可以作为猪胸膜肺炎疫苗的有效成分。谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 具有无内毒素和较发达分泌系统的优点, 是非常有潜力的重组细菌疫苗蛋白质表达系统。利用 *C. glutamicum* 表达系统生产 Apx II, 实现其高效稳定表达, 可为疫苗生产提供技术基础。前期研究已构建 Apx II 分泌表达菌株, 为进一步提高 Apx II 的表达产量, 通过在 24 孔板发酵优化, 得到最优的培养基为 CGXII-YT, 最优的表达温度为 30 ℃, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L, 加入 IPTG 前培养 6 h, 发酵培养时间为 24 h。进一步在摇瓶中放大发酵培养结果与 24 孔板发酵培养结果相同。最后在容积为 5 L 发酵罐中对 Apx II 进行表达, 与使用基础发酵培养基发酵相比, 使用 CGXII-YT 发酵培养基, 且在优化后的发酵条件下 Apx II 表达量明显提高, 达到了 114.60 mg/L。本研究实现了 Apx II 在谷氨酸棒杆菌中的分泌表达, 为其进一步扩大化生产提供了基础。

关键词: 细胞毒素 Apx II; 谷氨酸棒杆菌; 表达

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2024)12-2310-07

Expression of porcine contagious pleuropneumonia vaccine antigen Apx II in *Corynebacterium glutamicum* and optimization of fermentation conditions

CHENG Shiqian¹, KANG Jingyi¹, CHEN Mengxuan¹, LIU Xiuxia^{1,2,3}, YANG Yankun^{1,2,3}, BAI Zhonghu^{1,2,3}

(1. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Engineering and Technology Research Centre for Bioactive Product Processing, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a highly infectious and fatal respiratory disease, which has caused serious losses in the pig industry. Apx II is one of the main antigens of porcine contagious pleuropneumonia (PCP), which can be used as an effective component of porcine pleuropneumonia vaccine. *Corynebacterium glutamicum* has the advantages of endotoxin-free and more developed secretion system, and is a very promising recombinant bacterial vaccine protein expression system. The expression system of *C. glutamicum* was used to produce Apx II and achieve its efficient and stable

expression, which could provide a research basis for vaccine production. Apx II secretory expression strains were constructed in previous studies. In order to further improve the expression yield of Apx II, the fermentation in 24-well plates was optimized. The optimal medium was CGXII-YT, and the optimal expression temperature was 30 ℃. The concentration of IPTG was 1.0 mmol/L, the cul-

收稿日期: 2024-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(22078128)

作者简介: 程世前(1996-), 男, 河南义马人, 硕士, 主要从事发酵工程、医药蛋白表达等方面的研究。(E-mail) c5886602123@163.com

通讯作者: 白仲虎, (E-mail) baizhonghu@jiangnan.edu.cn

ture time was 6 h before adding IPTG, and the fermentation culture time was 24 h. The results were the same as those of 24-well plate fermentation. Finally, Apx II was expressed in a 5 L fermentor. Compared with the basic fermentation medium, the Apx II expression yield was significantly increased by using CGX II -YT fermentation medium, and the Apx II expression yield reached 114.60 mg/L under the optimized fermentation conditions. In this study, the secretory expression of Apx II in *Corynebacterium glutamicum* was realized, which provided a basis for its further expansion of production.

Key words: cytotoxin Apx II; *Corynebacterium glutamicum*; expression

猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumonia*, APP) 是猪传染性胸膜肺炎的病原体, 具有高度传染性, 通常是致命的, 已成为猪的主要传染病原菌之一, 对世界养猪业造成巨大影响^[1-4]。典型的亚单位疫苗有转铁结合蛋白质 (Tbp)、蛋白酶、渗透因子和菌毛等^[5-6]。其中, 细胞毒素 Apx、Tbp 具有免疫原性, 是 APP 的抗原, 可以作为疫苗的有效成分。细胞毒素 Apx 会破坏菌体自身形态造成发病^[7-8]。Apx II 是除了血清型 10 外, 都能体现 Apx 的一类毒素, 所以 Apx II 是 Apx 毒素中最有前途的候选疫苗^[9-10]。Wang 等^[11]通过给猪单独注射或添加到由重组 ApxI、ApxII、ApxIII 毒素和外膜蛋白质组成的多组分重组亚单位疫苗中, 结果发现对各种猪传染性胸膜肺炎 (PCP) 免疫反应都有一定的防护性。然而中国新型疫苗研究起步较晚, 研究主体有高校和科研院所, 如何实现兽用疫苗高质量、低成本生产仍然是各大疫苗企业关注的重点。

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 于 1950 年首次被科学家发现, 因其具备高产 L-谷氨酸的特点, 故命名为谷氨酸棒杆菌。C. glutamicum 属于放线纲放线菌目棒状杆菌属, 特点是严格好氧, 不产生孢子且血清甘胆酸 (CG) 含量高^[12], 被认作是食品级安全型微生物^[13]。研究结果发现, 谷氨酸棒杆菌在重组蛋白质分泌途径上同样具备此类特性^[14], 首先它具有非常优良的无内毒素特征, 不会影响疫苗质量^[15-16]; 其次是它的分泌表达体系完善, 包含两个完善的分泌途径 (Sec 途径和 Tat 途径), 具有很好的表达蛋白体系^[17]; 最后是在其胞外具有很少的蛋白酶^[18]。

本研究首先利用多孔板将 Apx II 在谷氨酸棒杆菌中进行发酵条件优化, 然后将其发酵工艺放大至摇瓶水平以及容积为 5 L 发酵罐水平, 验证此发酵工艺的有效性, 并首次在容积为 5 L 发酵罐中进行谷氨酸棒杆菌 CGMCC1.15647 分泌表达 Apx II, 探究谷氨酸棒杆菌对 Apx II 表达的可行性, 对其作为

宿主菌株表达外源蛋白生产疫苗提供可行性方案。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Apx II 表达载体 pXMJ19-tac-CspB-ApxII#5 和谷氨酸棒杆菌 CGMCC1.15647 均由江南大学实验室保存。

1.2 培养基的配制

种子培养基 (LBB): 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, BHI 10 g/L。基础发酵培养基: MgSO₄ 1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 20 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, BHI 30 g/L, 葡萄糖 30 g/L。补料培养基: 葡萄糖 300 g/L。供试发酵培养基有 LB、LBB、BHI、CGX II、CGX II -YT。

1.3 主要仪器和试剂

质粒提取使用 CWBIO 试剂盒 (江苏康为世纪生物科技股份有限公司产品)。序列插入使用 DNA 连接酶 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司产品], 聚合酶链反应 (PCR) 使用 Es Taq 聚合酶 (江苏康为世纪生物科技股份有限公司产品) 或 PrimerSTAR [宝日医生物技术 (北京) 有限公司产品] 进行。DNA 连接酶购自赛默飞世尔科技公司; 氯霉素购于上海麦克林生化科技股份有限公司; 其余培养基试剂均从上海国药集团有限公司购置。使用的仪器包括成都英德生物医药设备有限公司生产的恒温摇床, 赛默飞世尔科技公司生产的高速冷冻离心机、PCR 仪、超低温冰箱和凝胶成像仪, 瑞士 Tecan 公司生产的多功能酶标仪, 天根生化科技 (北京) 有限公司生产的恒温金属浴, 上海天能科技有限公司生产的核酸电泳系统、蛋白质凝胶电泳系统, 上海棱光技术有限公司生产的紫外分光光度计等。

1.4 应用 24 孔板与摇瓶培养 Apx II

挑取培养皿中单克隆菌株接种到摇瓶中 (瓶中含 10 mL LBB 培养基), 并放于 30 ℃ 恒温培养箱中 220 r/min 培养 12 h, 随后吸取 200 μL 上述种子液至深孔板中 (24 孔, 每孔含 1.8 mL LBB 培养基), 再次放入 30 ℃ 恒温培养箱中培养 4~6 h, 当孔内菌体呈

生长状态后添加适量浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 培养 24 h 后在 600 nm 波长下测定吸光度 (OD_{600}), 绘制生长柱图。在摇瓶培养中, 挑取单克隆菌株进行接种 (LBB 培养基体积占摇瓶容积的 1/10), 随后放置在 30 ℃ 恒温培养箱中 220 r/min 培养 12 h 后, 吸取 1 mL 上述种子液至新的摇瓶培养基中, 保持 30 ℃ 恒温, 220 r/min 培养 4~6 h, 再向摇瓶中添加适量浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG 继续培养 24 h, 测定 OD_{600} , 绘制生长柱图。

1.5 Apx II 5 L 发酵罐分批补料培养

单菌落在 LBB 培养基中培养 12 h 后, 按 10% 接种量转接到 5 L 发酵罐中 (罐内含 1.8 L 发酵培养基)。在发酵培养过程中转速设定与溶解氧含量相偶联, 其溶解氧设定为 30%, pH 设定为 7, 用氨水和 10% 磷酸调节 pH, 罐体温度设定为 30 ℃。每 4 h 取 1 次样, 整个培养过程中转速设定为 450~1 000 r/min。发酵 8 h 时后加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达并开启补料循环泵 (补充 300 g/L 的葡萄糖), 流速为 4 mL/(h·L)。每隔 4 h 取样 1 次, 测定 OD_{600} , 绘制生长图。

1.6 Apx II SDS-PAGE 分析和 BSA 蛋白浓度

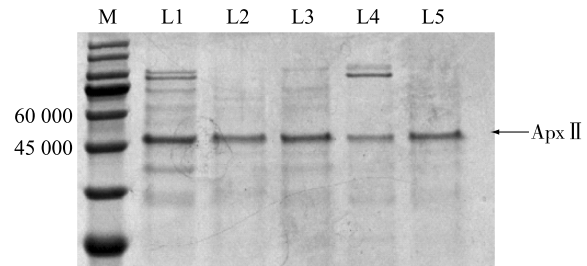
将蛋白质样品离心后取上清液分别与 5× 上样缓冲液混合, 制备成 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳样品。所有的样品用质量浓度为 120 g/L 的 SDS-PAGE 进行分析, 随后用考马斯亮蓝染色 10 min 并放置于匀速摇板上摇晃, 去染色液后加入脱色液过夜, 摇晃直至胶体变透亮后进行凝胶成像拍摄。蛋白质质量浓度测定使用 BCA 试剂盒, 将蛋白质标品定量分别配制成 0.025 mg/L、0.050 mg/L、0.100 mg/L、0.200 mg/L、0.300 mg/L、0.400 mg/L、0.500 mg/L 的标准品, 利用凝胶成像图分析蛋白质纯度, 根据不同质量浓度 BSA 绘制标准柱图, 使用软件 Image J 测定数值随后代入标准柱图中定量蛋白质 Apx II。

2 结果与分析

2.1 多孔板水平 Apx II 生产的发酵条件优化

2.1.1 Apx II 培养基的确定 为确定用于优化 Apx II 生产的基础培养基, 选用 LB、LBB、BHI、CGX II、CGX II-YT 5 种培养基, 对获得 Apx II 最优表达重组菌株进行发酵培养。种子培养基使用 LBB, 将平板上单菌落菌株接种到摇瓶内 LBB 培养基中, 30 ℃、220 r/min 过夜培养。按照 2% 接种量将其分别转接

到 BHI、LB、LBB、CGX II 及 CGX II-YT 摇瓶培养基中, 经 24 h 摇床发酵培养后, 测定其生物量并进行 SDS-PAGE 分析。选择表达量最高的 CGX II-YT 培养基为 Apx II 生产培养基 (图 1)。



M: 蛋白质 marker; L1: 泳道 1, BHI 培养基; L2: 泳道 2, LB 培养基; L3: 泳道 3, LBB 培养基; L4: 泳道 4, CGX II 培养基; L5: 泳道 5, CGX II-YT 培养基。

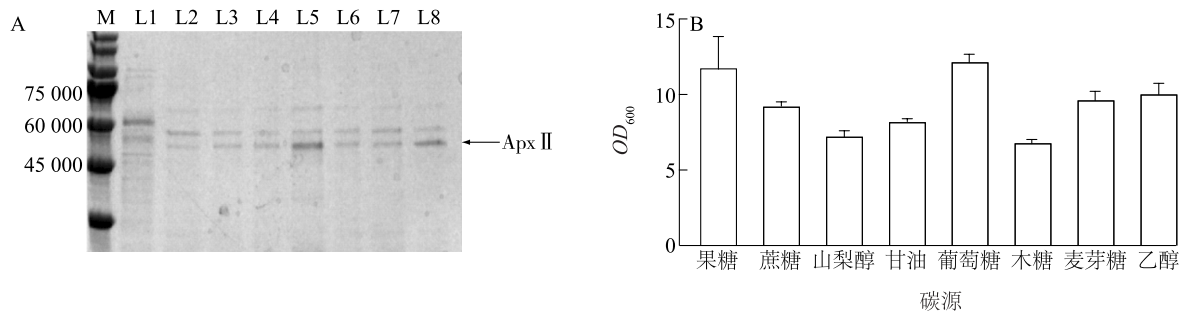
图 1 SDS-PAGE 分析 Apx II 表达量

Fig.1 Analysis of Apx II expression by SDS-PAGE

2.1.2 碳源对 Apx II 表达的影响 在 24 孔板中分别将果糖、蔗糖、山梨醇、甘油、葡萄糖、木糖、麦芽糖、乙醇添加到不含葡萄糖碳源的 CGX II-YT 培养基中, 使其最终质量浓度达到 10 g/L; 再分别接入 10% 等量的 Apx II 种子培养基, 在 30 ℃ 和 220 r/min 条件下诱导后培养 24 h, 收集发酵液的上清液, 测定其生物量并进行 SDS-PAGE 分析。根据图 2 所示, 当葡萄糖作为碳源时, 其细菌生长情况与 Apx II 表达水平均最佳, 因此后续使用葡萄糖作为碳源。

2.1.3 氮源对 Apx II 表达的影响 在 24 孔板中分别将 Yeast extract (进口)、Tryptone (进口)、大豆蛋白胨、酵母浸膏、硫酸铵、酪蛋白水解物、尿素、氯化铵添加到不含氮源的 CGX II-YT 培养基中, 使其最终质量浓度达到 18 g/L。分别接入 10% 等量的 Apx II 种子培养基, 在 30 ℃ 和 220 r/min 条件下培养 24 h, 收集发酵液的上清液, 测定其生物量并进行 SDS-PAGE 分析。根据图 3 所示, 大豆蛋白胨作为氮源时, 其细菌生长情况与 Apx II 表达水平均为最佳, 因此选择大豆蛋白胨作为氮源。

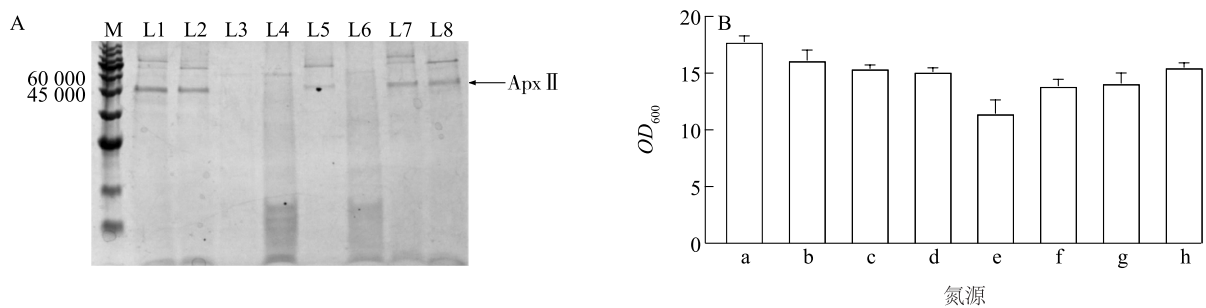
2.1.4 诱导温度对 Apx II 表达量的影响 为探究诱导温度是否有利于 Apx II 的可溶表达。在 24 孔板中使用不同诱导温度, 观察其对 Apx II 表达量的影响。发酵前期在 30 ℃ 条件下培养 6 h, 然后加入诱导剂分别调节温度至 20 ℃、25 ℃、28 ℃、30 ℃、35 ℃。如图 4 所示, 诱导温度为 30 ℃ 时 Apx II 的表达水平最高, 后续试验诱导温度选用 30 ℃。



M: 蛋白质 marker; L1: 泳道 1, 果糖; L2: 泳道 2, 蔗糖; L3: 泳道 3, 山梨醇; L4: 泳道 4, 甘油; L5: 泳道 5, 葡萄糖; L6: 泳道 6, 木糖; L7: 泳道 7, 麦芽糖; L8: 泳道 8, 乙醇。

图 2 不同碳源条件下 Apx II 的表达水平 (A) 以及表达菌株的生长情况 (B)

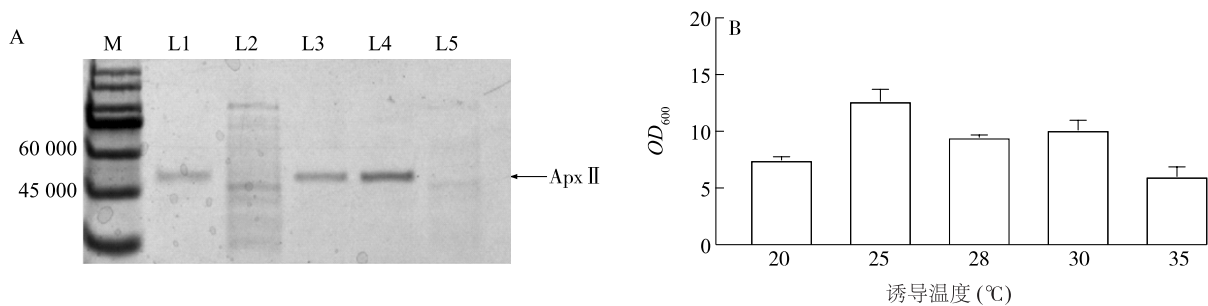
Fig.2 Expression levels of Apx II under different carbon sources (A) and the growth of the expression strain (B)



M: 蛋白质 marker; L1: 泳道 1, 大豆蛋白胨; L2: 泳道 2, Tryptone; L3: 泳道 3, 酵母浸膏; L4: 泳道 4, Yeast extract; L5: 泳道 5, 硫酸铵; L6: 泳道 6, 尿素; L7: 泳道 7, 酪蛋白水解物; L8: 泳道 8, 氯化铵。a: 大豆蛋白胨; b: Tryptone; c: 酵母浸膏; d: Yeast extract; e: 硫酸铵; f: 尿素; g: 酪蛋白水解物; h: 氯化铵。

图 3 不同氮源条件下 Apx II 的表达水平 (A) 以及表达菌株的生长情况 (B)

Fig.3 Expression levels of Apx II under different nitrogen sources (A) and the growth of the expression strain (B)



M: 蛋白质 marker, L1: 泳道 1, 20 °C; L2: 泳道 2, 25 °C; L3: 泳道 3, 28 °C; L4: 泳道 4, 30 °C; L5: 泳道 5, 35 °C。

图 4 不同诱导温度条件下 Apx II 的表达水平 (A) 以及表达菌株的生长情况 (B)

Fig.4 Expression levels of Apx II at different mutagenic temperatures (A) and the growth of the expression strain (B)

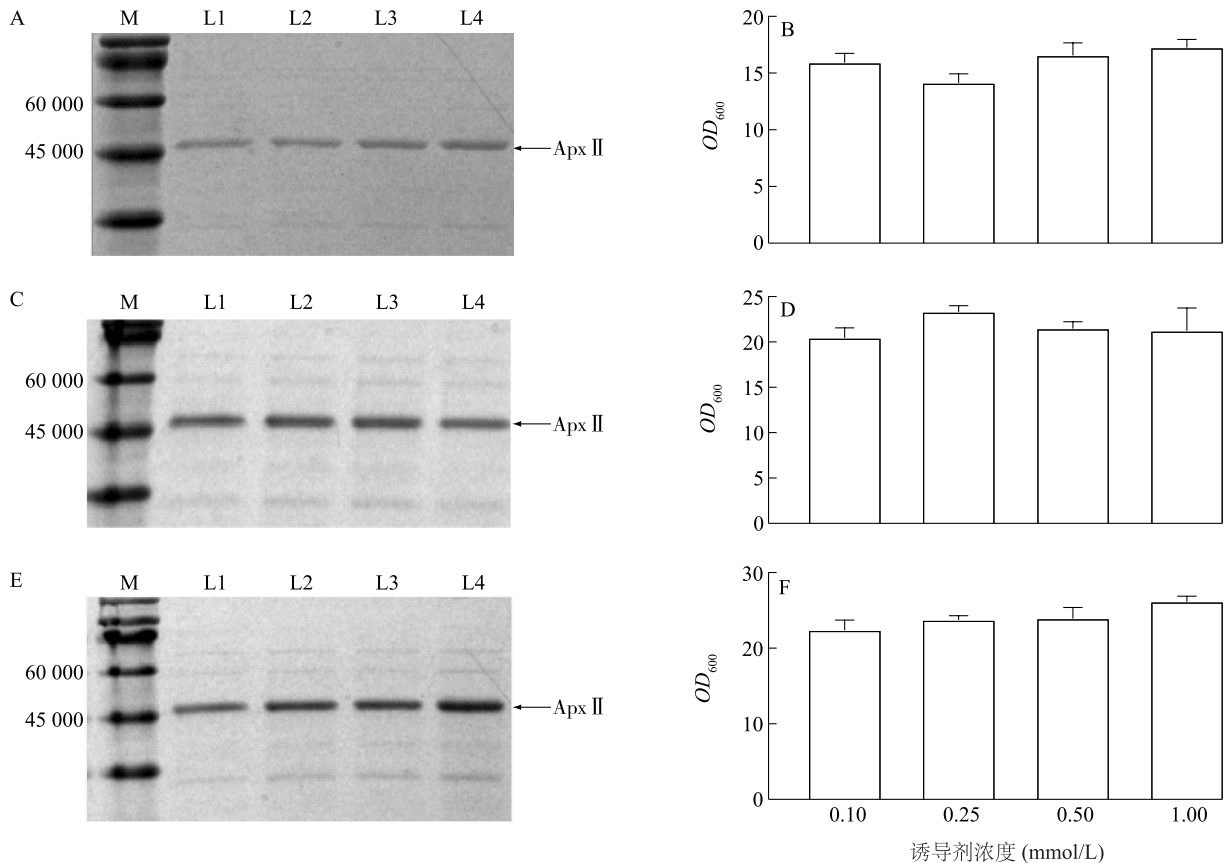
2.2 摇瓶中 Apx II 生产的发酵条件优化

将先前探究的 24 孔板 Apx II 表达条件放大到摇瓶规模进行 Apx II 表达, 根据不同诱导温度和诱导剂添加量, 在 CGXII-YT 培养基中接入 10% 种子培养基, 在 30 °C 和 220 r/min 条件下培养 24 h, 测量表达菌株生物量并取样品上清液进行分析。如图 5 所示, 在摇瓶规模放大试验中获得最佳条件为: 诱导温度 30 °C,

诱导剂添加浓度为 1 mmol/L IPTG。

2.3 Apx II 在 5 L 发酵罐中的表达

将 Apx II 表达菌株在 LBB 培养基中培养 12 h, 然后按 10% 接种量转接到含有 1.8 L 发酵培养基的容积为 5 L 的发酵罐中。在发酵培养过程中, 发酵 12 h 后加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达并开启补料循环泵, 流速为 4 mL/(h · L)。每隔 4 h 取样 1 次,



A: 20 °C 诱导温度条件下 Apx II 的表达水平; B: 20 °C 诱导温度条件下表达菌的生长情况; C: 25 °C 诱导温度条件下 Apx II 的表达水平; D: 25 °C 诱导温度条件下表达菌的生长情况; E: 30 °C 诱导温度条件下 Apx II 的表达水平; F: 30 °C 诱导温度条件下表达菌的生长情况。图 A、图 C、图 E 中 M 表示蛋白质 marker; L1 表示泳道 1, 诱导剂添加量 0.10 mmol/L; L2 表示泳道 2, 诱导剂添加量 0.25 mmol/L; L3 表示泳道 3, 诱导剂添加量 0.50 mmol/L; L4 表示泳道 4, 诱导剂添加量 1.00 mmol/L。

图 5 Apx II 表达摇瓶放大试验结果

Fig.5 Results of Apx II expression in shaker amplification experiment

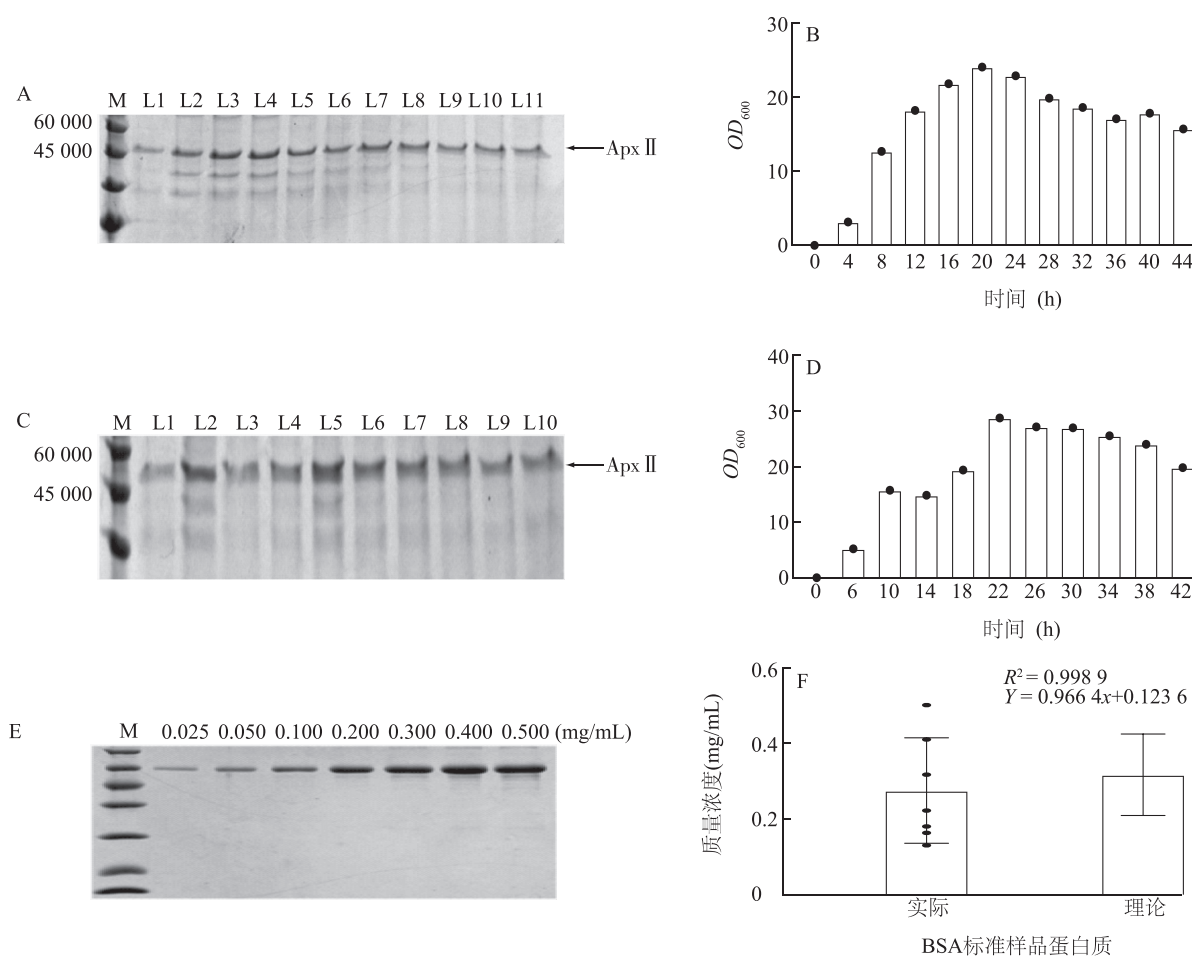
记录 OD_{600} , 离心去样品上清液与 5× 上样缓冲液混合后进行 SDS-PAGE 分析, 将 BSA 蛋白标准品梯度稀释后进行 SDS-PAGE 分析和灰度分析, 将分析结果代入 BSA 标品验证图中对 Apx II 的表达进行定量, 使用基础发酵培养基, Apx II 在 5 L 发酵罐中的产量为 84.99 mg/L; 使用 CGX II -YT 发酵培养基且在优化后的发酵条件下培养发酵 Apx II 表达菌株, 5 L 发酵罐中 Apx II 表达量达到 114.60 mg/L (图 6)。

3 讨论与结论

由于猪胸膜肺炎传播力强、危害大, 疫苗接种是预防其暴发的有效策略。其中 Apx 为其放线杆菌的毒素, 所包含的 Apx II 是解决猪胸膜肺炎亚单位疫苗的重要环节。前人研究多通过大肠杆菌来表达 Apx II, 其包涵体情况尤为突出, 很大程度上影响了

Apx II 的分泌表达。使用谷氨酸棒杆菌进行 Apx II 的表达, 既符合疫苗安全生产的要求, 又符合实际生产中对疫苗产量的要求, 为进行亚单位疫苗生产提供了一个全新的方向。

本研究以谷氨酸棒杆菌 CGMCC1.15647 为表达宿主, 进行 Apx II 的分泌表达, 实现了 Apx II 可溶性表达的能力。在 24 孔板中通过确定基础培养基, 优化培养基碳源和氮源成分、发酵温度等发酵条件, 提高了 Apx II 的表达量, 并在摇瓶中进行了放大验证, 随后在 5 L 发酵罐中对培养基分批补料进行探索与优化, 首次将 Apx II 表达在谷氨酸棒杆菌中进行 5 L 发酵罐放大试验, 使用基础发酵培养基, 在 5 L 发酵罐中 Apx II 表达量为 84.99 mg/L, 发酵条件优化后使用 CGX II -YT 培养基, 5 L 发酵罐中 Apx II 表达量提升到 114.60 mg/L。



A:使用基础发酵培养基在5 L发酵罐中Apx II的表达(M表示蛋白质 marker;L1表示泳道1,培养4 h;L2表示泳道2,培养8 h;L3表示泳道3,培养12 h;L4表示泳道4,培养16 h;L5表示泳道5,培养20 h;L6表示泳道6,培养24 h;L7表示泳道7,培养28 h;L8表示泳道8,培养32 h;L9表示泳道9,培养36 h;L10表示泳道10,培养40 h;L11表示泳道11,培养44 h)。B:使用基础发酵培养基在5 L发酵罐中不同培养时间Apx II的表达量;C:使用CGX II-YT发酵培养基发酵条件优化后在5 L发酵罐中Apx II的表达(M表示蛋白质 marker;L1表示泳道1,培养6 h;L2表示泳道2,培养10 h;L3表示泳道3,培养14 h;L4表示泳道4,培养18 h;L5表示泳道5,培养22 h;L6表示泳道6,培养26 h;L7表示泳道7,培养30 h;L8表示泳道8,培养34 h;L9表示泳道9,培养38 h;L10表示泳道10,培养42 h);D:使用CGX II-YT发酵培养基发酵条件优化后在5 L发酵罐中不同培养时间Apx II的表达量;E:SDS-PAGE分析BSA标准样品蛋白质;F:BSA标准样品蛋白质验证。

图6 在5 L发酵罐中Apx II的表达

Fig.6 Expression of Apx II in a 5 L fermenter

本研究实现了Apx II在谷氨酸棒杆菌的高效可溶性表达,并首次进行了放大培养,初步优化发酵条件,为后续的放大化生产和应用提供了基础。

参考文献:

- [1] HAESBROUCK F, CHIERS K, VAN OVERBEKE I, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 58(2/3/4): 239-249.
- [2] BOSSÉ J T, JANSON H, SHEEHAN B J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(2): 225-235.
- [3] 郭志英, 李郁, 吴浩阳. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定及其生物学特性的研究[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(9): 1102-1109.
- [4] FREY J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins [J]. *Trends Microbiol*, 1995, 3(7): 257-261.
- [5] CHIERS K, DE WAELE T, PASMANS F, et al. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host [J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(5): 65.
- [6] BROGAARD L, KLITGAARD K, HEEGAARD P M H, et al. Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs chal-

- lenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. BMC Genomics, 2015,16(1):15.
- [7] CHIANG C H, HUANG W F, HUANG L P, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Apx I A and Apx II A DNA vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* lethal challenge in murine model[J]. Vaccine, 2009, 27(34):4565-4570.
- [8] SEO K W, KIM D H, KIM A H, et al. Characterization of antigenic determinants in Apx II A exotoxin capable of inducing protective immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge[J]. Immunological Investigations, 2011, 40(5):465-480.
- [9] TO H, NAGAI S, IWATA A, et al. Genetic and antigenic characteristics of Apx II A and Apx III A from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3, 4, 6, 8 and 15[J]. Microbiology and Immunology, 2016, 60(7):447-458.
- [10] LOERA-MURO A, ANGULO C. New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 217:66-75.
- [11] WANG C L, WANG Y, SHAO M L, et al. Positive role for rApx-IVN in the immune protection of pigs against infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Vaccine, 2009, 27(42):5816-5821.
- [12] NAKAYAMA Y. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensing: from osmoregulation to l-glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis[J]. Microorganisms, 2021, 9(1):201.
- [13] 徐美娟,上官春雨,陈鑫,等. 谷氨酸棒杆菌耐受胁迫机制及工业鲁棒性合成生物学研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(3):831-845.
- [14] 董贵彬,潘颖越,司雅楠,等. 人胃内因子在谷氨酸棒杆菌中的表达及活性研究[J]. 生物学杂志, 2020, 37(2):5-9.
- [15] HAYAT S M G, FARAHANI N, GOLICHENARI B, et al. Recombinant pro-teín expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): what we need to know[J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(6):718-725.
- [16] 孙曼曼,高 雄,方求武,等. 谷氨酸棒杆菌增强型表达载体构建及牛 α -干扰素表达[J]. 生物学杂志, 2020, 37(3):16-20.
- [17] LIU X X, ZHANG W, ZHAO Z H, et al. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4):541-551.
- [18] LIU X X, MENG L H, WANG X Y, et al. Effect of Clp protease from *Corynebacterium glutamicum* on heterologous protein expression[J]. Protein Expression and Purification, 2021, 189:105928.

(责任编辑:黄克玲)