

铜绿假单胞菌 $F_{190-342} - I_{21-83}$ 基因的克隆及其融合蛋白的原核表达

张明亮^{1,2,3}, 闫新武⁴, 孙长江², 顾敬敏², 崔子寅², 韩文瑜^{2*}

(1. 河南省动物疫病防控与营养免疫院士工作站,河南 安阳 455000; 2. 吉林大学 动物医学学院,吉林 长春 130062;
3. 安阳工学院 生物与食品工程学院,河南 安阳 455000; 4. 河南省孟津县动物卫生监督所,河南 孟津 471100)

摘要: 为了研究铜绿假单胞菌外膜蛋白 F 和 I 的重要表位,根据已公布的 F 和 I 基因序列设计 2 对特异性引物,以分离的水貂源铜绿假单胞菌 ZHDL9 基因组为模板,扩增重要的表位基因 $F_{190-342}$ ($F1$) 和 I_{21-83} ($I2$),并对得到的 2 段基因序列进行生物信息学分析。结果表明,PCR 扩增所得 $F1$ 和 $I2$ 两段基因序列高度保守,不存在核苷酸的插入和缺失;通过融合 PCR 技术将得到的 $F1$ 基因和 $I2$ 基因无缝连接,得到 651 bp 的融合基因 $F1I2$ 。将融合基因 $F1I2$ 克隆至原核表达载体 pET-28a,成功构建了融合表达质粒 pET-28a- $F1I2$;将 pET-28a- $F1I2$ 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),成功构建重组菌株 BL21 (pET-28a- $F1I2$),并对重组菌株进行 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 检测表明,成功表达了融合蛋白 F1I2,且融合蛋白能够被 His 镍柱纯化;Western Blotting 检测表明,表达的融合蛋白 F1I2 与铜绿假单胞菌 ZHDL9 菌株感染的水貂血清具有较好的反应原性。

关键词: 铜绿假单胞菌; F 基因; I 基因; 克隆; 融合蛋白; 原核表达

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)12-0132-06

Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* $F_{190-342} - I_{21-83}$ and Prokaryotic Expression of Recombinant Protein

ZHANG Mingliang^{1,2,3}, YAN Xinwu⁴, SUN Changjiang², GU Jingmin²,
CUI Ziyin², HAN Wenyu^{2*}

(1. Academician Workstation of Animal Disease Control and Nutrition Immunity in Henan Province, Anyang 455000, China; 2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;
3. College of Biological Science and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, China;
4. Animal Health Supervision Institute of Mengjin in Henan Province, Mengjin 471100, China)

Abstract: To study the epitope of outer membrane protein F and I from *Pseudomonas aeruginosa*, two pairs of specific primers were designed according to the published F and I gene sequences, and the epitope gene $F_{190-342}$ ($F1$) and I_{21-83} ($I2$) were amplified from *Pseudomonas aeruginosa* ZHDL9 separated in mink. Bioinformatics analysis was performed on the obtained two-stage gene sequences. The results showed that the two gene sequences were highly conserved and there was no nucleotide insertion or deletion. The $F1$ and $I2$ gene were seamlessly ligated by the overlap PCR to obtain a 651 bp fusion gene $F1I2$, then the fusion gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a, and the fusion expression plasmid pET-28a- $F1I2$ was constructed. Then the expression plasmid pET-28a- $F1I2$ was transformed into *E. coli*

收稿日期:2018-06-06
基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2011AA10A210);国家自然科学基金青年基金项目(31802170);安阳工学院博士科研启动基金项目(BSJ2016013)
作者简介:张明亮(1985-),男,河南驻马店人,讲师,博士,主要从事病原微生物和分子免疫学研究。
E-mail:mingliang90909@163.com 闫新武为同等贡献作者
* 通讯作者:韩文瑜(1955-),男,河北阜城人,教授,博士,主要从事兽医微生物学和免疫学研究。
E-mail:hanwy@jlu.edu.cn

BL21 (DE3) strain, and the recombinant strain BL21 (pET-28a-*FII2*) was constructed. And the recombinant strain was induced by IPTG. The result of SDS-PAGE showed that fused protein FII2 was expressed from BL21 (pET-28a-*FII2*), and the fused protein FII2 could be purified by His nickel column. And the result of Western Blotting showed that obtained expression proteins had good reactivity with serum of mink infected with *Pseudomonas aeruginosa* ZHDL9.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *F* gene; *I* gene; Cloning; Recombinant protein; Prokaryotic expression

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)属革兰氏阴性杆菌,能够引起以鼻孔及嘴角流血为主要特征的水貂出血性肺炎,造成发病水貂突然死亡。自1953年首次确认铜绿假单胞菌是水貂出血性肺炎的病原以来,该病在全球迅速扩散,给水貂养殖业带来了巨大的损失^[1]。长期以来,抗生素是防治水貂出血性肺炎的有效武器。然而,随着抗生素的滥用,铜绿假单胞菌的耐药性呈现日渐升高的趋势,常规抗生素对其防治效果越来越差。因此,亟须开发新的防治手段。

F 基因和 *I* 基因分别编码铜绿假单胞菌的 2 种外膜蛋白。研究表明,铜绿假单胞菌的外膜蛋白 *F* 在铜绿假单胞菌黏附真核细胞的过程中起着重要的作用,参与了诸多侵染过程^[2]。铜绿假单胞菌拥有众多血清型,但外膜蛋白 *F* 高度保守的特性突出。外膜蛋白 *F* 作为铜绿假单胞菌重要的孔蛋白,在前期的研究中展现出了良好的免疫原性,能够使动物和人类免受多种血清型铜绿假单胞菌的感染,已被证实是应对铜绿假单胞菌的重要保护性抗原^[3]。此外,外膜蛋白 *I* 作为重要的保守抗原,也能诱导动物产生高滴度的抗体,在清除感染动物体内铜绿假单胞菌方面显示出很大的优势^[4]。 $F_{190-342} - I_{21-83}$ 是 *F* 蛋白和 *I* 蛋白重要肽表位的融合体^[5],在小鼠感染模型、烧伤模型等研究中凸显出产生保护性抗体的优越性^[6]。但在铜绿假单胞菌引发的水貂出血性肺炎的病原检测方面以及保护性生物制品的开发方面,关于 *F* 蛋白和 *I* 蛋白的应用尚属空白。因此,本研究在临床分离的水貂源铜绿假单胞菌 ZHDL9 菌株基因组的基础上,克隆出铜绿假单胞菌

外膜蛋白 *F* 和 *I* 的表位基因 $F_{190-342}$ (*FI*) 和 I_{21-83} (*I2*),将其无缝融合后,构建原核表达重组质粒 pET - 28a - *FII2*,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达融合蛋白 FII2,旨在为防治水貂出血性肺炎生物制品的研究与开发提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及血清

水貂源铜绿假单胞菌 ZHDL9 菌株、大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21 (DE3)、表达质粒 pET - 28a 及 ZHDL9 菌株水貂阳性血清(效价 1:2 000)均来自于河南省动物疫病防控与营养免疫院士工作站。

1.2 主要试剂

铜绿假单胞菌选择性分离培养基(溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基)购自青岛高科园海博生物技术有限公司;Ex *Taq* DNA polymerase、T4 DNA 连接酶、DL15000 DNA Marker 及 DL2000 DNA Marker 均购自 Takara 公司;限制性内切酶购自 Promega 公司;质粒及细菌基因组提取试剂盒均购自 Omega 公司;TAB 显色液购自福建迈新生物科技有限公司;HRP 标记的兔抗水貂 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;His 标签蛋白纯化镍柱购自 Thermo 公司;标准蛋白质 Marker 购自 NEB 公司。

1.3 引物的设计与合成

参照 GenBank 公布的 *OprF* 序列 (JX040481.1) 与 *OprI* 序列 (X58714.1) 分别设计含有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的引物 PF1/PF2 与 PI1/PI2,引物合成由北京六合华大基因科技股份有限公司完成(表 1)。

表 1 铜绿假单胞菌 *FI* 和 *I2* 基因的 PCR 扩增引物序列

基因	引物	序列 (5'-3')	扩增产物大小/bp
<i>FI</i>	PF1	<u>GAATTC</u> GCTCCGGCTCCGGAACCGTTGCC	462
	PF2	TTCGCTTCTTTGGAGTGGCTGGCTCAACGCCACGGTTGATAGC	
<i>I2</i>	PI1	GAAGCCAGCCACTCCAAAGAAACC	189
	PI2	<u>AAGCTT</u> TACTTGGGGCTGGCTTTTTC	

注:下划线部分为限制性酶切位点。

1.4 铜绿假单胞菌基因组及质粒提取

参照 Omega 公司基因组提取试剂盒及质粒提

取试剂盒说明书获得铜绿假单胞菌 ZHDL9 菌株基因组及质粒提取产物。

1.5 铜绿假单胞菌 *FII2* 融合基因的获取

以获得的 ZHDL9 菌株基因组为模板,采用引物 PF1/PF2 扩增 *F1* 基因片段,反应程序为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。以获得的 ZHDL9 菌株基因组为模板,采用引物 PI1/PI2 扩增 *I2* 基因片段,反应程序为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。

将上述所得 *F1* 和 *I2* 基因进行融合,共分 2 步进行。第 1 步反应程序为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s,10 个循环;72 ℃ 5 min。第 2 步反应程序为:94 ℃ 2 min;94 ℃ 40 s,62 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。

将最终获得的 *FII2* 融合基因克隆至 pMD18-T 质粒中,阳性重组质粒命名为 pMD18-T-*FII2*,送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.6 重组表达菌株 BL21 (pET-28a-*FII2*) 的构建及鉴定

将获得的重组质粒 pMD18-T-*FII2* 与质粒 pET-28a 同时用限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R I 进行双酶切,然后回收 *FII2* 融合基因片段和 pET-28a 质粒片段,并用 T4 DNA 连接酶连接。转化至大肠杆菌感受态 BL21 (DE3),将阳性转化子 BL21 (pET-28a-*FII2*) 扩大培养,小批量制备质粒,用内切酶 *Eco*R I 和 *Hind*Ⅲ消化后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鉴定。

1.7 融合蛋白 FII2 的诱导表达及纯化

将重组菌株 BL21 (pET-28a-*FII2*) 和对照菌株 BL21 (pET-28a) 分别接种至含 50 μg/mL KANA 的 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时,加入 1 mmol/L 的 IPTG,25 ℃ 诱导 8 h。分别取适量菌液于 1.5 mL EP 管中,离心后弃上清,使用无菌 PBS 重悬菌体,并加入 5 × Loading Buffer,煮沸 10 min,离心后取上清,用 12% SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。电泳结束后,将蛋白胶置于染色液中,染色 2 h。最后,将蛋白胶置于脱色液中脱色至条带清晰。

将诱导表达的重组菌 BL21 (pET-28a-*FII2*) 离心后,用无菌 PBS 洗涤 2 遍,取适量的 MES Buffer 重悬沉淀。将重悬菌液置于小烧杯中,并在冰浴中超声破碎,待菌液超声破碎至澄清时,取出菌液。6 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取上清。上清经 0.8 μm 滤器过滤后加入准备好的 His 标签蛋白纯化镍柱,进行 *FII2* 融合蛋白的纯化。最后向纯化柱中加入适量的洗脱液洗脱蛋白质,SDS-PAGE 检测纯化后的融合蛋白 *FII2*。

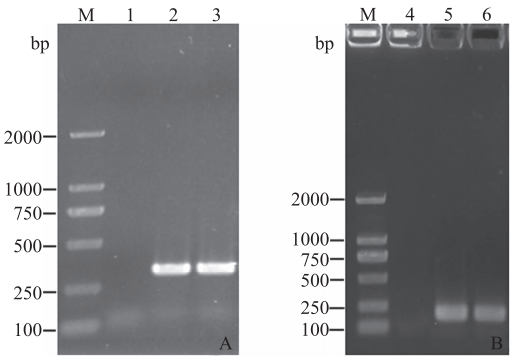
1.8 融合蛋白 FII2 表达的检测

Western Blotting 检测重组蛋白的表达情况。首先将重组菌 BL21 (pET-28a-*FII2*) 和对照菌 BL21 (pET-28a) 的纯化蛋白样品电泳后转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,转膜时间为 7 min。转膜结束后,将其置于封闭液中,室温封闭 4 h。以 ZHDL9 菌株水貂阳性血清为一抗、HRP 标记的兔抗水貂 IgG 为二抗,TAB 避光显色后观察结果。

2 结果与分析

2.1 *F1* 基因和 *I2* 基因的克隆及信息学分析

对 PCR 扩增得到的 *F1* 基因 (图 1A) 和 *I2* 基因 (图 1B) 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后,分别得到 462 bp 和 189 bp 的条带,与目的条带大小相符。



M:DL2000 DNA Marker; 1,4:阴性对照; 2,3:*F1* 基因 PCR 扩增产物; 5,6:*I2* 基因 PCR 扩增产物

图 1 *F1* 基因 (A) 和 *I2* 基因 (B) 的 PCR 扩增结果

将 PCR 扩增得到的 *F1* 和 *I2* 基因序列分别与 NCBI 上登录的铜绿假单胞菌序列 MFY72、ATCC3542、LMG1242 和 W15AUG19、ATCC3542、PAO1 进行比对分析,同源性分别在 99.6% ~ 100.0% 和 99.5% ~ 100.0%,表明 *F1* 基因序列和 *I2* 基因序列与已报道的序列相比高度保守 (图 2A 和 2B)。

2.2 重组表达菌株 BL21 (pET-28a-*FII2*) 的构建及鉴定

F1 基因和 *I2* 基因经融合 PCR 后,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到的 *FII2* 融合基因条带与 651 bp 的预测条带大小相符,表明成功构建了融合基因 *FII2* (图 3A)。将得到的融合基因 *FII2* 连接至 pMD18-T 质粒,得到重组质粒 pMD18-T-*FII2* (图 3B),经限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind*Ⅲ消化后,出现的条带与 651 bp 的目的条带大小一致 (图 3B)。对酶切鉴定正确的重组质粒 pMD18-T-*FII2* 进行测序,分析结果表明,序列不存在核苷酸的缺失和插入。将测序正确的 *FII2* 基因片段连接至 pET-28a 质粒,转化至大肠杆菌感受态 BL21 (DE3),培养阳性转化子 BL21 (pET-

28a - $FII2$) 后,小批量制备质粒,用内切酶 $EcoR$ I 和 $Hind$ III 消化,电泳后所得条带与 651 bp 的目的条带大小一致,表明成功构建了重组表达菌株 BL21 ($pET - 28a - FII2$) (图 3C)。

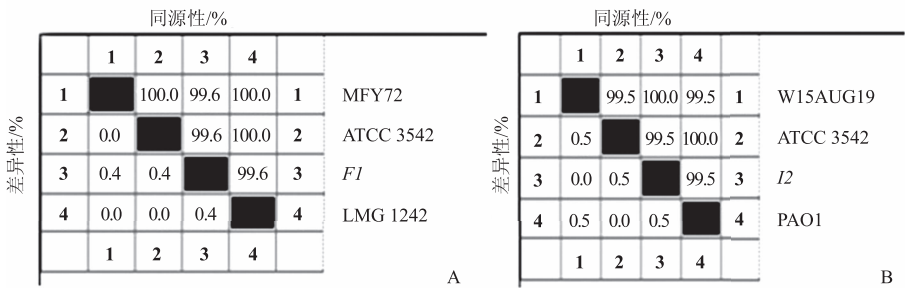
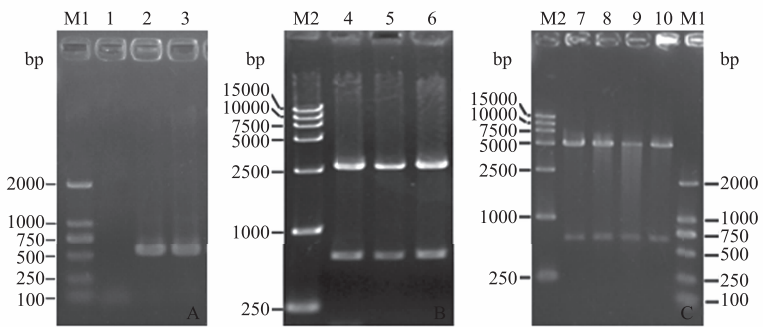


图 2 FII 基因序列 (A) 和 $I2$ 基因序列 (B) 同源性分析



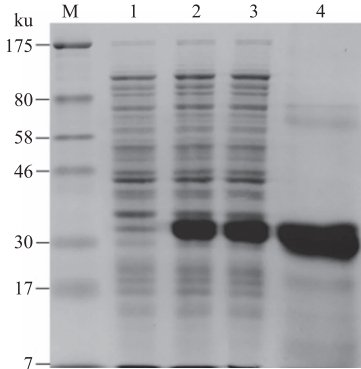
A:融合基因 $FII2$ 的 PCR 扩增; B:重组质粒 $pMD18 - T - FII2$ 的双酶切鉴定; C:重组表达质粒 $pET - 28a - FII2$ 的双酶切鉴定。

M1:DL2000 DNA Marker; M2:DL15000 DNA Marker; 1:阴性对照; 2,3: $FII2$ PCR 扩增结果;
4—6: $pMD18 - T - FII2$ 酶切结果; 7—10: $pET - 28a - FII2$ 酶切结果

图 3 重组原核表达菌株 BL21 ($pET - 28a - FII2$) 的构建及验证

2.3 融合蛋白 FII2 的表达及纯化

分别用 IPTG 诱导重组表达菌株 BL21 ($pET - 28a - FII2$) 和对照菌 BL21 ($pET - 28a$),通过 SDS - PAGE 电泳,结果发现,与对照菌株 BL21 ($pET - 28a$) 相比,可在 BL21 ($pET - 28a - FII2$) 中约 30 ku 处观察到蛋白质表达条带,与预测的 FII2 融合蛋白大小相符(图 4)。同时得到的融合蛋白 FII2 可以被 His 镍柱纯化,表明其具有良好的可溶性。

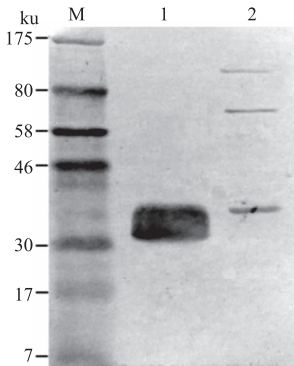


M:蛋白质分子质量标准; 1:空载体对照;
2,3:重组菌表达; 4:纯化的 $FII2$ 蛋白

图 4 BL21 ($pET - 28a - FII2$) 表达产物的 SDS - PAGE 电泳分析

2.4 融合蛋白 FII2 的 Western Blotting 分析

重组菌和对照菌经 SDS - PAGE 电泳、转膜后,以 ZHDL9 阳性血清作为一抗,HRP 标记的兔抗水貂 IgG 作为二抗,结果显示,可在约 30 ku 处观察到反应条带,表明原核表达的融合蛋白 FII2 能与铜绿假单胞菌 ZHDL9 株感染的水貂血清发生特异性的免疫反应,而对照菌则不能发生反应(图 5)。



M:蛋白质分子质量标准; 1:重组菌; 2:对照菌

图 5 融合蛋白 FII2 的 Western Blotting 分析

3 结论与讨论

铜绿假单胞菌是一种重要的人兽共患病原菌,

广泛存在于天然环境中,常常引起医院病人的获得性感染,特别是患败血症、免疫受损或被抑制的病人,同时还能升高囊性纤维化病人的发病率和死亡率^[7]。铜绿假单胞菌也能感染狗、猫、猪、水貂、狐狸、貉子等动物,疫苗被认为是防控感染性疾病最有力的武器^[8-9]。近些年来,众多有效的铜绿假单胞菌抗原及新的抗原携带系统逐渐被筛选与开发出来,其中包括一些铜绿假单胞菌的结构部分,如鞭毛、菌毛、脂多糖、外膜蛋白和所分泌的毒素 A 等物质,它们均已被证明是有效疫苗的靶抗原^[10]。

一般情况下,细菌能够通过感应胞外的信号来调节代谢以适应环境的变化,铜绿假单胞菌是通过外膜来感应胞外信号,这些外膜组分可能作为毒力因子的成分参与侵染过程^[11]。外膜蛋白 F 在铜绿假单胞菌众多孔蛋白中占有很少的比例,但它能够允许离子及小分子的营养物质以非特异性的方式扩散^[12]。通常情况下,外膜蛋白 F 被认为是一种结构蛋白,能将外膜锚定在肽聚糖层^[13]。由于外膜蛋白 F 位于铜绿假单胞菌的外膜表面,由它介导的病原与宿主之间相互作用的现象被逐渐揭示,许多研究表明,外膜蛋白 F 确实参与诸多侵染进程,例如它能够介导病原菌与真核细胞的黏附^[14],以及厌氧条件下生物膜的形成^[15]。此外,外膜蛋白 F 与 IFN- γ 相互作用后能够促使细菌产生凝集素 PA-1L 和吩嗪绿脓毒素^[16],这 2 种毒素的产生表明外膜蛋白 F 可作为宿主免疫系统的传感器^[17]。与此同时,外膜蛋白 F 也可能通过激活 QS 系统促使了 2 种毒素的产生^[18-19]。这些研究表明,外膜蛋白 F 通过修饰 QS 系统可增强细菌的毒力,进而介导了与宿主的相互作用,但有趣的是,接种外膜蛋白 F 和 I 融合蛋白的人血清能够抑制铜绿假单胞菌与 IFN- γ 的结合,这表明 IFN- γ 新的作用机制能够消除铜绿假单胞菌的毒力^[20-21]。因此,外膜蛋白 F 能够作为铜绿假单胞菌疫苗的重要候选蛋白,来防御铜绿假单胞菌的感染。外膜蛋白 I 也被学者们广泛研究,据报道,OprI 可以结合到呼吸道和肠道黏膜表面,有望作为黏膜免疫的载体,促进抗原传递到抗原提呈细胞^[22]。与此同时,研究者利用重组外膜蛋白 I 免疫小鼠,小鼠获得了能够抵御铜绿假单胞菌攻击的能力^[23]。近些年来,人们将 2 种蛋白质的重要抗原部位融合表达发现,其也具有较好的免疫效果。研究表明,在小鼠模型中,接种 OprF-OprI 疫苗可以预防小鼠全身性绿脓杆菌感染^[24]。在人体 I/II 期临床试验中,为健康志愿者肌肉注射 OprF-OprI 疫苗,疫苗作用安全且能够诱导特异性抗体产生^[25]。

本研究获得铜绿假单胞菌的重要外膜蛋白表位基因 *F1* 和 *I2*,并将其融合在一起进行表达,为铜绿假单胞菌疫苗的设计及开发奠定了基础。融合得到的表位疫苗具有很多优势,能被具有多种遗传背景的主要组织相容性复合体(MHC)分子识别并结合,从而得到高效的递呈;它在细胞免疫方面也具有独特的优势,可有效应对病原微生物的变异和免疫反应中的诸多不利因素。因此,本研究利用 pET-28a 表达载体成功表达了可溶性较好的 F1I2 融合蛋白,它能与特异性血清发生较好的反应,为 F1I2 融合蛋白功能的进一步研究及新型高效生物制品的研发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Zhao Y, Guo L, Li J, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2018, 82(4):256-263.
- [2] Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF[J]. Infection Immunity, 2011, 79(3):1176-1186.
- [3] Ding B, von Specht B U, Li Y. OprF/I-vaccinated sera inhibit binding of human interferon-gamma to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Vaccine, 2010, 28(25):4119-4122.
- [4] Finke M, Duchêne M, Eckhardt A, et al. Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*[J]. Infection Immunity, 1990, 58(7):2241-2244.
- [5] Zhang M, Sun C, Gu J, et al. Salmonella Typhimurium strain expressing OprF-OprI protects mice against fatal infection by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology and Immunology, 2015, 59(9):533-544.
- [6] Hughes E E, Gilleland H Jr. Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P. aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model[J]. Vaccine, 1995, 13(18):1750-1753.
- [7] Bodey G P, Bolivar R, Fainstein V, et al. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Reviews of Infectious Diseases, 1983, 5(6):279-313.
- [8] Hilleman M R. Vaccines in historic evolution and perspective: A narrative of vaccine discoveries[J]. Vaccine, 2000, 18(15):1436-1447.
- [9] 蒋增海, 邓同伟, 徐耀辉, 等. 猪源绿脓杆菌的分离鉴定及 16S rRNA 基因同源性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(4):118-120, 133.
- [10] Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines[J]. Human Vaccines, 2011, 7(10):999-1011.

(下转第 150 页)

参考文献:

- [1] 盛顺,安红艳,刘旺. CO₂ 增施技术对日光温室生菜生长的影响[J]. 中国农机化学报,2017,38(1):52-55.
- [2] 李峰,张会臣,张仲新,等. 二氧化碳气肥对温室葡萄的应用效果[J]. 北方果树,2016(1):11-12.
- [3] 汪海霞,袁云刚,徐敏,等. 设施草莓增施 CO₂ 气肥试验[J]. 山西果树,2018(1):1-2.
- [4] 刁春武,黄忠阳,岳明灿,等. 棚室增施 CO₂ 对油麦菜生长的影响[J]. 农业开发与装备,2017(9):99-100.
- [5] 姜珊,谭峰,侯召龙,等. 模糊控制在温室大棚控释 CO₂ 气肥系统中的应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):190-195.
- [6] 刘妍华,曾志雄,郭嘉明,等. 增施 CO₂ 气肥对温室流场影响的数值模拟及验证[J]. 农业工程学报,2015,31(12):194-199.
- [7] 郭嘉明,吕恩利,陆华忠,等. 保鲜运输车果蔬堆码方式对温度场影响的数值模拟[J]. 农业工程学报,2012,28(13):231-236.
- [8] 方慧,杨其长,张义,等. 基于 CFD 的不同走向大跨度保温型温室温度场模拟[J]. 中国农业大学学报,2017,22(11):133-139.
- [9] 何科爽,陈大跃,孙丽娟,等. 不同风况和开窗配置对夏季单栋塑料温室微气候的影响[J]. 农业机械学报,2017,48(12):311-318,339.
- [10] 王新忠,张伟建,张良,等. 基于 CFD 的夏季屋顶全开型玻璃温室自然通风流场分析[J]. 农业机械学报,2016,47(10):332-337.
- [11] 尚春明,董晓菲,王玉静,等. 增施 CO₂ 对温室番茄产量、品质及病害的影响[J]. 北方农业学报,2017,45(5):33-36.
- [12] Kempkes F L K, Van de Braak N J, Bakker J C. Effect of heating system position on vertical distribution of crop temperature and transpiration in greenhouse tomatoes [J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 2000,75(1):57-64.
- [13] Fourati F, Chtourou M. A greenhouse control with feed-forward and recurrent neural networks[J]. Simulation Modeling Practice and Theory, 2007,15(8):1016-1028.
- [14] 岳钉伊,潘铜华,王嘉维,等. 增施 CO₂ 与 LED 补光对日光温室番茄生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(7):81-89,96.
- [15] 李永欣,李保明,李真,等. Venlo 型温室夏季自然通风降温的 CFD 数值模拟[J]. 中国农业大学学报,2004,9(6):44-48.
- [11] Lesouhaitier O, Veron W, Chapalain A, et al. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules [J]. Sensors (Basel), 2009,9(9):6967-6990.
- [12] Nestorovich E M, Sugawara E, Nikaido H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: Properties of the channel [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006,281(24):16230-16237.
- [13] Horzempa J, Dean C R, Goldberg J B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycosylation: Glycan substrate recognition[J]. Journal of Bacteriology, 2006,188(12):4244-4252.
- [14] Azghani A O, Idell S, Bains M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture[J]. Microbial Pathogenesis, 2002,33(3):109-114.
- [15] Yoon S S, Hennigan R F, Hilliard G M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: Relationships to cystic fibrosis pathogenesis [J]. Developmental Cell, 2002,3(4):593-603.
- [16] Wu L C, Estrada O, Zaborina O, et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Science, 2005,309(6):774-777.
- [17] Wagner V E, Frelinger J G, Barth R K, et al. Quorum sensing: Dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals [J]. Trends Microbiology, 2006,14(2):55-58.
- [18] Alayande A B, Aung M M, Kim I S. Correlation between quorum sensing signal molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s biofilm development and virulency [J]. Current Microbiology, 2018,75(7):787-793.
- [19] Sugawara E, Nagano K, Nikaido H. Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Febs Journal, 2012,279(6):910-918.
- [20] Wu L, Estrada O, Zaborina O, et al. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Science, 2005,309:774-777.
- [21] Bouffartigues E, Moscoso J A, Duchesne R, et al. The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level [J]. Frontiers Microbiology, 2015,6:630-673.
- [22] Loots K, Revets H, Goddeeris B M. Attachment of the outer membrane lipoprotein (OprI) of *Pseudomonas aeruginosa* to the mucosal surfaces of the respiratory and digestive tract of chickens [J]. Vaccine, 2008,26(4):546-551.
- [23] Kazemi E, Owlia P, Jahangiri A, et al. Conserved OprF as a selective immunogen against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Iran Journal of Pathology, 2017,58(2):165-170.
- [24] Knapp B, Hundt E, Lenz U, et al. A recombinant hybrid outer membrane protein for vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Vaccine, 1999,17(13/14):1663-1666.
- [25] Mansouri E, Blome-eberwein S, Gabelsberger J, et al. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burn patients [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003,37(2/3):161-166.

(上接第 136 页)