

◆ 生物技术 ◆

VP_{AHPND} 毒力蛋白 PirAB 的原核表达与纯化^{*}范贤平^{1,2},张晟¹,蒋葛²,曹晓慧²,乔毅²,成婕²,徐军田¹,胡闯显³,沈辉^{2**}

(1. 江苏海洋大学海洋生命与水学院,江苏连云港 222000;2. 江苏省海洋水产研究所,江苏南通 226007;3. 江苏农垦金鲤渔业有限公司,江苏盐城 224500)

摘要:急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease,AHPND)是一种新型对虾病害,其病原为一种携带编码二元毒素蛋白 PirAB 的弧菌(VP_{AHPND}),可感染对虾且致死率高。本研究利用 GenBank 公布的 *pirAB* 全基因序列设计特异性引物,通过 PCR 获得目的基因 *pirA*、*pirB*、*pirAB* 并克隆至表达载体 pET 21b (+) 中,构建 BL21-pET21b-*pirA*、BL21-pET21b-*pirB*、BL21-pET21b-*pirAB* 原核表达体系;通过对诱导剂浓度、诱导温度和诱导时间进行优化,分析重组蛋白的最佳表达条件;采用 Ni 磁珠对重组蛋白进行纯化,并以 Western-blot 方法分析其抗原性。结果表明,PirA、PirB、PirAB 的重组蛋白分子质量分别约为 17 kDa、50 kDa 和 (50 + 17) kDa,与预期大小一致。重组蛋白的最佳诱导条件:IPTG 浓度 0.01 mmol/L,PirA 和 PirAB 30℃ 诱导 24 h,PirB 30℃ 诱导 4 h,蛋白均呈现可溶性表达;纯化后的重组蛋白具有较好的反应原性,可为下一步的抗体制备和 AHPND 致病机理研究提供充足的实验材料。

关键词:AHPND *pirAB* 基因 毒力蛋白 副溶血弧菌 原核表达

中图分类号:S945.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2022)06-1103-08

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20230110.010

急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease,AHPND)是一种新出现的对虾病害,可感染凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),死亡率为 70% - 100%^[1]。据相关研究表明,AHPND 病原为携带一个 69 kD 的 pVA1 质粒,

可编码 *pirA*、*pirB* 毒力基因的一类弧菌(VP_{AHPND}),通过基因重组和敲除技术,发现 *pirA* 和 *pirB* 的突变导致菌株致病力消失,证明 PirA 和 PirB 毒力蛋白是引起 AHPND 的主要致病因子^[2]。Victorio-De Los Santos 等^[3]通过克隆重组 PirA 和 PirB 毒力蛋白,发现 PirB 亚基是一种特异性氨基糖凝集素,可与

收稿日期:2022-03-08

修回日期:2022-03-29

* 国家农业长期性基础性重大疫病监测项目(NAES-AH-011),江苏省农业专项(2022-SJ-037-02),中国盐城渔业高质量发展研究课题(YCSCYJ2021005)和南通市科技计划项目(JCZ20045,JC2021089)资助。

【作者简介】

范贤平(1991-),女,在读硕士研究生,主要从事水产动物病害防治研究,E-mail:2858560635@qq.com。

【**通信作者】

沈辉(1981-),男,正高级工程师,硕士研究生导师,主要从事水产动物病害防治研究,E-mail:darkhui@163.com。

【引用本文】

范贤平,张晟,蒋葛,等.VP_{AHPND} 毒力蛋白 PirAB 的原核表达与纯化[J].广西科学,2022,29(6):1103-1110.

FAN X P,ZHANG S,JIANG G,et al. Prokaryotic Expression and Purification of VP_{AHPND} Virulence Protein PirAB [J]. Guangxi Sciences,2022,29(6):1103-1110.

虾肝胰腺上皮细胞膜上受体分子结合,从而触发细胞大量脱落,这进一步证实了 PirA、PirB 毒力蛋白是 AHPND 的关键致病因子。

研究发现 *pirA* 和 *pirB* 毒力基因共同位于 1 665 bp 的基因片段上, *pirA* (336 bp) 与 *pirB* (1 317 bp) 基因之间相隔 12 bp 基因序列,该序列分析结果与荧光发光杆菌 (*Photobacterium*) 的 *pirA2B2*^[4] 和致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 的 *pirAB*^[5] 基因相似,二者都利用自身的启动子进行表达,重组表达产生的 PirAB 毒素对四龄棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 具有较强的杀虫毒性^[6]。Sirikharin 等^[7]将 *pirA* 和 *pirB* 基因片段分别克隆并连接到 pET-17b 载体和 pGEX-4T-1 载体,并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL-21(DE3) 中表达,结果发现单独表达 *pirA* 或 *pirB* 基因所得到的蛋白没有毒性或毒性较低,猜测 PirA 和 PirB 重组蛋白需要结合才能诱发 AHPND 的典型症状。然而,诱导死亡所需的重组 PirA 和重组 PirB 组合的数量相对较高,其次表达载体、重组蛋白的构建方法和表达细胞系的选择不同,可能导致重组蛋白的构象和活性发生变化,影响毒力大小^[7-10],最后 PirA 和 PirB 在致病机制中的作用尚未完全确定。本研究通过 PCR 扩增获得 VP_{AHPND} 的毒力基因,克隆并连接到 pET 21b(+) 原核表达载体上,并进行原核表达和纯化,以获取大量 PirA、PirB 及 PirAB 蛋白,为下一步的 PirA/PirB 毒力和抗体的研究积累技术基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

VP_{AHPND} 菌株 (编号 1669) 和表达质粒 pET 21b(+) 由江苏省海洋水产研究所生物技术室保存并提供,克隆菌株 *E. coli* Top10、表达菌株 *E. coli* BL-21

Table 1 PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>pirA</i> -F-NheI	GGAGATATACATATGGCTAGCATGAGTAACAATATAAAACATGAAACTGACT
<i>pirA</i> -R-Scal	GCAAGCTTGTGTCGACGGAGCTCTTAGTGGTAATAGATTGTACAGAAACCAG
<i>pirB</i> -F-NheI	GGAGATATACATATGGCTAGCATGACTAACGAATACGTTGTAACAATGT
<i>pirB</i> -R-Scal	GCAAGCTTGTGTCGACGGAGCTCCTACTTTTCTGTACCAAATTCATCGG
<i>pirAB</i> -F-NheI	GGAGATATACATATGGCTAGCATGAGTAACAATATAAAACATGAAACTGACT
<i>pirAB</i> -R-Scal	GCAAGCTTGTGTCGACGGAGCTCCTACTTTTCTGTACCAAATTCATCGG

(DE3) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 试剂及仪器

高分子量蛋白 marker、2 × Taq PCR Master Mix、DNA 分子量 marker、NheI 和 Scal 限制性内切酶、异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)、辣根过氧化氢酶 DAB 显色试剂盒、Mag-Beads His-Tag 蛋白纯化磁珠、硝酸纤维素印迹膜 (NC 印迹膜)、10 × TBST WB 漂洗液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化 (北京) 科技有限公司; 兔抗 (PirA 和 PirB) 一抗、山羊抗兔 IgG 二抗 (辣根过氧化物酶 HRP 标记) 购自康为世纪生物科技有限公司, ClonExpress II 重组克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。蛋白电泳槽 (DYCZ-24DN)、湿转仪 (DYCZ-40D) 购自北京六一生物科技有限公司; 冷冻离心机、PCR 仪、移液枪均购自德国艾本德公司 (Eppendorf); 超微量分光光度计 (DeNovix DS-11) 购自广州市深华生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 目的片段的扩增

将经平板纯化的 VP_{AHPND} 1669 菌种转接到 LB 液体培养基, 28℃、200 r/min 培养 16 h, 6 000 g 离心收集菌体, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。根据 GenBank 登录的 *pirAB* 基因 (NC_025152.1) 序列设计 3 对引物, 分别用于扩增 *pirA*、*pirB*、*pirAB* (表 1)。下划线分别为 NheI、Scal 两个酶切位点。*pirA* 引物: *pirA*-F-NheI/*pirA*-R-Scal, *pirB* 引物: *pirB*-F-NheI/*pirB*-R-Scal, *pirAB* 引物: *pirAB*-F-NheI/*pirAB*-R-Scal。反应体系: 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, DNA 模板 1 μL, 上下

游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用 DNA 纯化回收试剂盒纯化并回收目的片段。

1.3.2 重组表达质粒的构建

使用 *NheI* 和 *Scal* 限制性内切酶酶切载体 pET 21b(+),酶切体系:ddH₂O 11 μL ,载体 30 μL ,10 \times QuickCut Buffer 5 μL ,*NheI* 和 *Scal* 各 2 μL ;酶切反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 DNA 回收试剂盒纯化并回收目的片段。利用 ClonExpress II 重组克隆试剂盒将 *pirA*、*pirB* 和 *pirAB* 的 PCR 扩增 DNA 片段连接到质粒载体 pET 21b(+),将连接产物转化到感受态细胞 Top10 中,涂布于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后,挑取单克隆进行 *NheI* 和 *Scal* 双酶切验证,验证正确的质粒送南京擎科生物科技有限公司测序。将鉴定正确的重组表达质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中,涂布于 LB 平板(添加 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,挑取单克隆菌落送南京擎科生物科技有限公司测序,进一步验证连接的正确性及所克隆基因的完整性。

1.3.3 重组蛋白表达条件的优化

将鉴定正确的重组菌接种至含 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养过夜。为得到高浓度的重组蛋白,对诱导表达过程中的 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间进行优化。时间和温度优化:在 1.0 mmol/L IPTG 浓度下,分别于 20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以 150 r/min 摇床培养 4 h、8 h、12 h、16 h、20 h 和 24 h,各取 2 mL 菌液进行检测。IPTG 浓度优化:分别以 0.01 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L IPTG 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 诱导 16 h,各取 2 mL 菌液,离心弃上清。将菌体用 0.01 mol/L PBS 缓冲液重悬,冰浴超声波破碎菌体,超声条件:45 W、超声 5 s 停 5 s,总时间 5 min,超声后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,

分别取其上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,确定最佳诱导条件。

1.3.4 重组蛋白的纯化与分析

按 1:100 体积比接种过夜培养的重组菌液于 500 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 液体培养基中,160 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养菌液至 OD_{600} 为 0.6-0.8;以实验确定的诱导时间、温度、IPTG 浓度诱导表达重组蛋白。诱导表达结束后,10 000 g 离心 10 min 收取菌体,并用 0.01 mol/L PBS 重悬菌体进行超声波破碎,10 000 g 离心 10 min 收取上清液。按照 Mag-Beads His-Tag 蛋白纯化磁珠说明书进行操作,使用含有不同浓度咪唑 (5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、50 mmol/L、500 mmol/L) 的洗脱缓冲液进行目标蛋白纯化,并收集洗脱液。纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,并采用微量分光光度计测定其蛋白质含量。

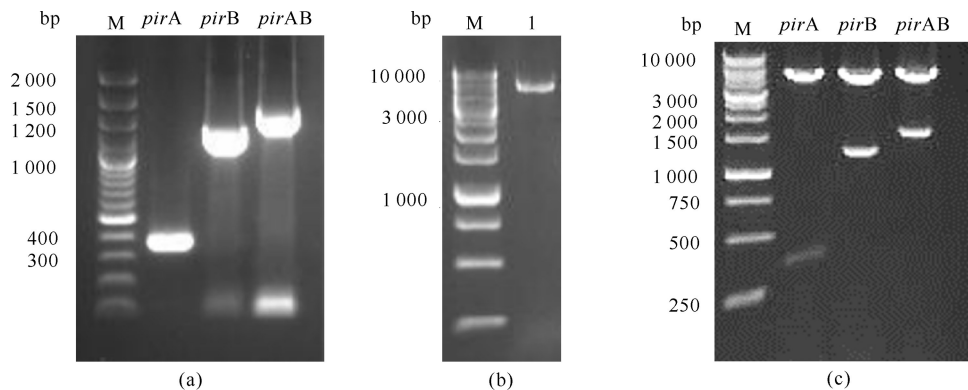
1.3.5 Western blot 检测重组蛋白表达

纯化蛋白经 12% SDS-PAGE 分离,转移至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂牛奶于室温封闭过夜;用 1 \times TBST WB 漂洗液洗涤 3 次,每次 5 min;加入兔抗 (PirA 和 PirB) 一抗 (1:1 000 稀释),室温孵育 2-3 h;1 \times TBST WB 漂洗液洗涤 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:4 000 稀释),于室温孵育 1 h;1 \times TBST 漂洗液洗涤 3 次,每次 10 min。最后用辣根过氧化物酶 DAB 显色试剂盒底物显色液显色,观察结果。

2 结果与分析

2.1 表达菌株的构建

pirA、*pirB* 及 *pirAB* 扩增片段分别为 336 bp、1 317 bp、1 665 bp,与预测目的条带大小一致[图 1(a)];空载质粒 pET 21b(+) 双酶切后全长为 5 442 bp [图 1(b)];将目的片段和双酶切后的 pET 21b(+) 质粒载体连接后,获取重组质粒 pET21b-*pirA*、pET 21b-*pirB*、pET21b-*pirAB*,经双酶切验证,条带大小与预测一致[图 1(c)]。经测序结果分析,*pirA*、*pirB* 和 *pirAB* 序列成功克隆至载体质粒中。



M: DNA marker, (a) Electrophoresis of PCR amplified fragments, (b) Double enzyme digestion of pET 21b(+) vector fragments, (c) Double enzyme digestion of recombinant plasmids

图1 重组表达质粒 pET 21b-*pirA*、pET 21b-*pirB*、和 pET 21b-*pirAB* 的构建

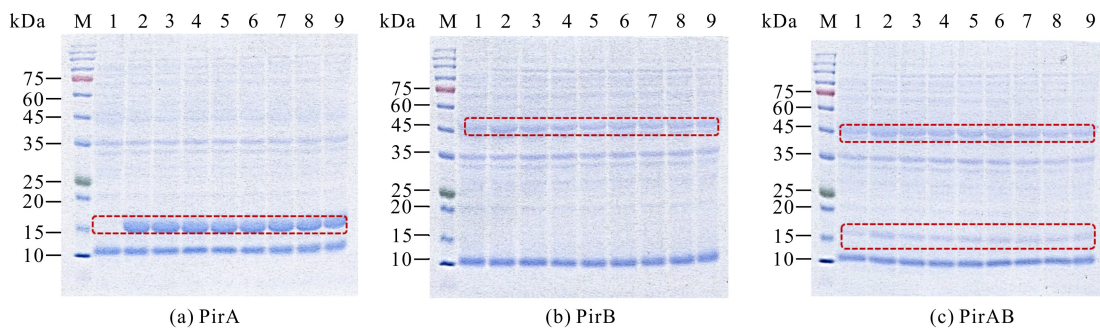
Fig. 1 Construction of recombinant expression plasmids pET 21b-*pirA*, pET 21b-*pirB*, and pET 21b-*pirAB*

2.2 重组蛋白表达分析

2.2.1 IPTG 浓度对诱导表达的影响

PirA (17 kDa)、PirB (50 kDa) 及 PirAB (50 + 17) kDa 在 8 个浓度梯度组中均呈现清晰的目的条带, 表明 8 个浓度的 IPTG 都能诱导重组 PirA、PirB 和 PirAB 蛋白的表达, PirB 和 PirAB 在不添加 IPTG

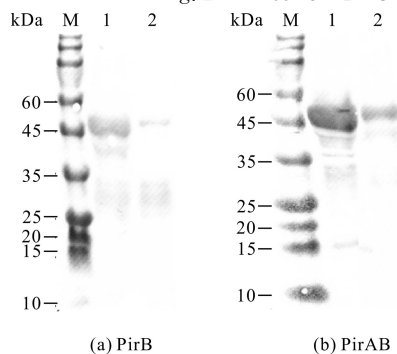
的情况下也能成功表达 (图 2)。重组蛋白 PirB 和 PirAB 在 IPTG 浓度为 0 时的表达量显著低于 IPTG 浓度为 0.01 mmol/L 的表达量 (图 3), 其他浓度的 IPTG 对重组蛋白表达量影响较小。因此, 确定诱导重组蛋白 PirA、PirB 和 PirAB 表达的 IPTG 最适浓度为 0.01 mmol/L。



M: Protein molecular weight standard; 1-9: Supernatant of induced bacterial crushing solution (IPTG concentrations were 0 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L, respectively); The target protein is shown in the frame

图2 IPTG 浓度对重组蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of IPTG concentration on the expression of recombinant protein



M: Protein molecular weight standard; 1: IPTG concentration of 0.01 mmol/L; 2: IPTG concentration of 0 mmol/L

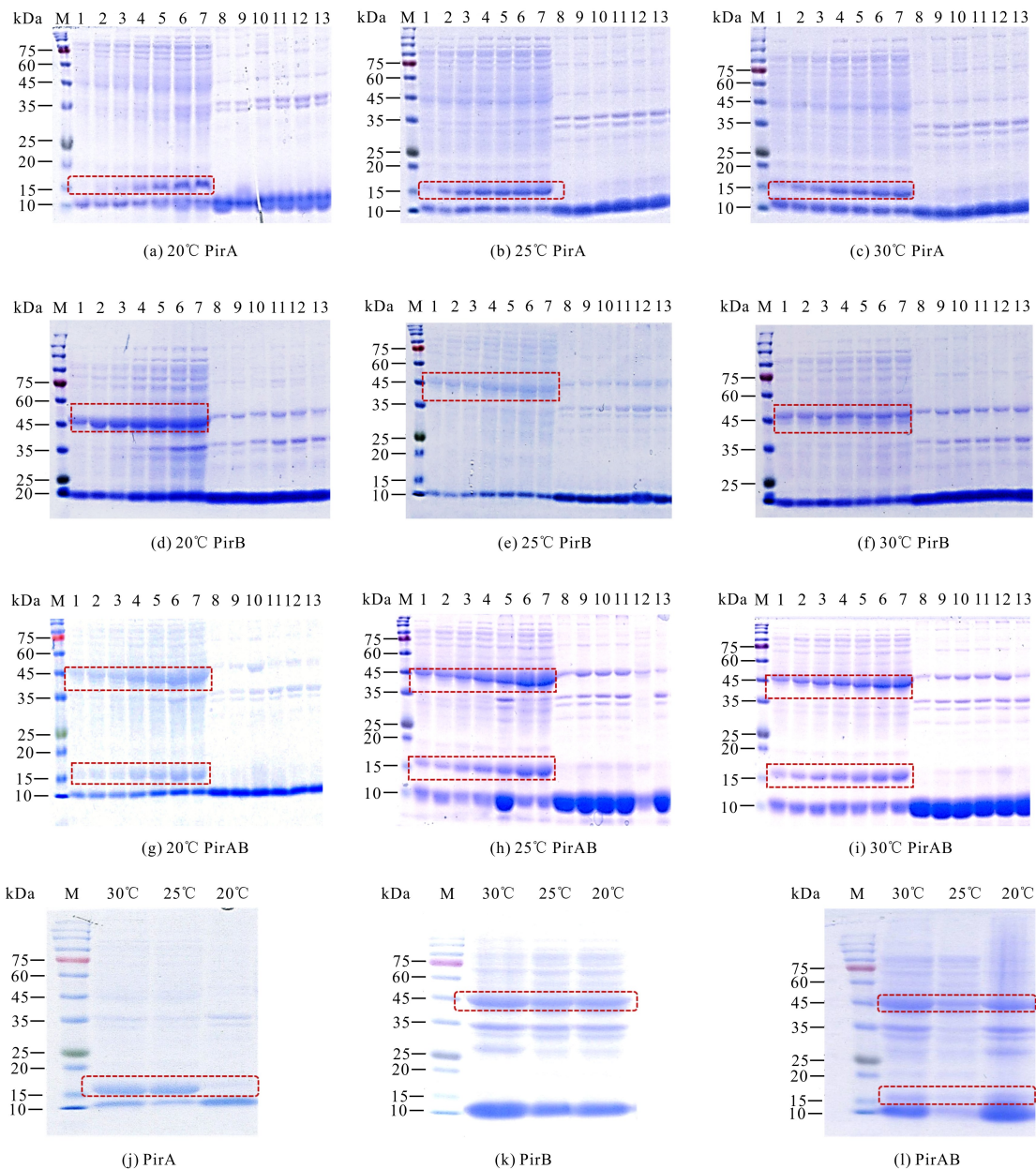
图3 PirB 和 PirAB 蛋白的 Western blot 鉴定结果

Fig. 3 Western blot identification results of PirB and PirAB protein

2.2.2 诱导温度和时间对诱导表达的影响

重组表达的温度和诱导时间结果表明, 随着诱导时间的延长, 重组蛋白 PirA 和 PirAB 表达量显著上升, 并于 24 h 达到峰值; 重组蛋白 PirB 的表达量在诱导 4 h 后没有显著变化 (图 4)。重组蛋白在 20℃、25℃ 和 30℃ 条件下均能较好地表达, 细菌裂解液的上清液和沉淀中都能观察到目的条带, 根据目的条带的粗细可知, 80% 左右的重组蛋白为可溶性表达 (图 4)。如图 4: (j) - (l) 所示, 在 20℃、25℃、30℃ 条件下, PirA 和 PirAB 诱导 24 h, PirB 诱导 4 h 时, 上清液样品 SDS-PAGE 结果中 30℃ 诱导培养时重组蛋白 PirA、PirB 和 PirAB 表达量最大。以上结果表明,

30℃为 PirA、PirB 和 PirAB 重组蛋白的最适诱导温度,重组蛋白 PirA 和 PirAB 的最适诱导时间为 24 h,重组蛋白 PirB 的最适诱导时间为 4 h。



M:Protein molecular weight standard;1:Broken liquid of uninduced bacteria;2-7:Supernatant of the disrupted liquid of induced bacteria (times are 4 h,8 h,12 h,16 h,18 h,24 h, respectively);8-13:Broken induced bacteria liquid precipitation (times are 4 h,8 h,12 h,16 h,18 h,24 h, respectively);The target protein is shown in the frame

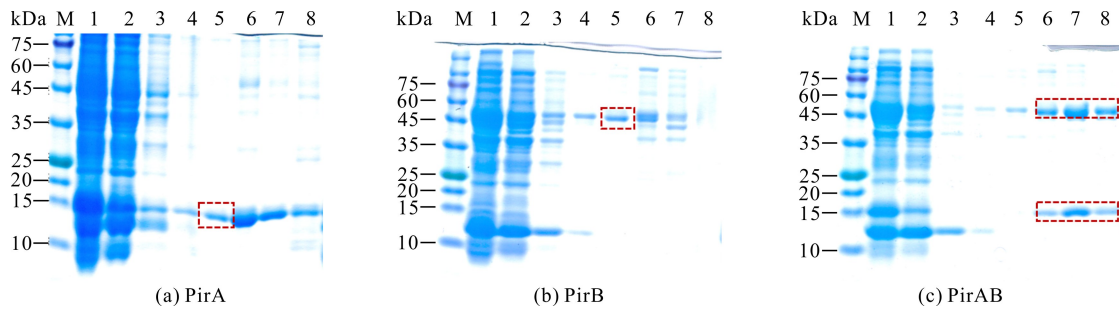
图4 诱导时间和温度对重组蛋白 PirA、PirB 和 PirAB 表达的影响

Fig. 4 Effect of induction time and temperature on the expression of recombinant proteins PirA, PirB and PirAB

2.3 重组蛋白纯化及浓度测定

重组蛋白经纯化后浓度为 1.2 - 2.0 mg/mL, PirA、PirB 重组蛋白经 10 mmol/L 咪唑洗脱后能得到高纯度蛋白, PirAB 经 20 mmol/L、50 mmol/L、

500 mmol/L 咪唑洗脱液后均能得到高纯度蛋白,获得的 3 种高纯度重组蛋白均可满足多克隆抗体制备的要求(图 5)。



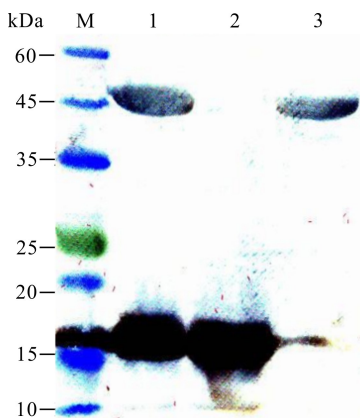
M: protein molecular weight standard; 1: Unpurified crude protein; 2, 3: Wash miscellaneous liquid; 4 - 8: Eluent (imidazole concentration is 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L, 50 mmol/L, 500 mmol/L); The target protein is shown in the frame

图5 PirA、PirB和PirAB蛋白纯化产物的SDS-PAGE电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of purification products of proteins PirA, PirB and PirAB

2.4 Western blot 检测重组蛋白表达

Western blot 检测结果显示, PirA、PirB及PirAB分别在17 kDa、50 kDa及(50+17) kDa附近显色(图6),与预测蛋白大小一致,表明所获得的纯化重组蛋白均具有较好的免疫原性。



M: protein molecular weight standard; 1: PirAB; 2: PirA; 3: PirB

图6 PirA、PirB和PirAB蛋白纯化产物Western blot分析

Fig. 6 Western blot analysis of purified products of proteins PirA, PirB and PirAB

3 讨论

AHPND主要致病因子为毒力蛋白PirAB,大量获取该蛋白的方式主要为硫酸铵沉淀法和异源表达。致病菌菌体中毒力蛋白PirAB表达量少,硫酸铵沉淀法获得的毒力蛋白杂蛋白多,后期纯化复杂,不利于后期的攻毒实验。原核表达系统可以目标明确地获得大量融合蛋白,通过亲和层析纯化,可有效降低杂蛋白含量,获得高纯度重组目的蛋白^[11]。本研究直接将pirAB的全序列插入含有6个His标签的pET 21b(+)载体中,然后将重组质粒转入*E. coli* BL21(DE3),并对重组菌种的表达条件进行优化,最

后成功表达了PirA、PirB和PirAB重组蛋白。

诱导剂IPTG为乳糖类似物,不受细胞代谢的影响,但IPTG对*E. coli*生长亦存在抑制作用,因此,在不影响融合蛋白表达的基础上应选用最小的剂量^[12]。柴政斌等^[13]发现,IPTG浓度对融合蛋白GST-PADI4的表达量无明显影响,但可溶性目的蛋白的比例会随着浓度的升高而增加。在本研究中,IPTG浓度为0时的PirB及PirAB表达量显著低于浓度为0.01 mmol/L的表达量,其他浓度的IPTG对重组蛋白表达量影响较小。另外,相关研究表明,低温诱导蛋白能促进蛋白的正确折叠,从而得到较好的可溶性蛋白,但合成的速率较慢^[14]。本研究发现,PirA、PirB和PirAB重组蛋白主要以可溶性蛋白形式存在,不易形成包涵体,尽管不同诱导温度对各重组蛋白的表达影响较小,但在30℃条件下,重组蛋白的表达比例最高。这一结果与叶彩燕^[15]诱导表达VP_{AHPND} PirB蛋白的诱导温度一致。

PirAB与苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)杀虫蛋白Cry具有较高的同源性,推测PirAB破坏宿主细胞的作用机制与Cry毒素较相似^[16]。Lin等^[17]的研究表明,在纯化PirA和PirB单体的情况下,两者相互结合的亲和力较低,并提出了这两种二元毒力复合物的异四聚体相互作用模型,认为PirA和PirB蛋白在重组的情况下形成的PirA/PirB复合体才会具有较强的细胞毒性,且PirA/PirB的结构也不稳定。pirA和pirB基因位于毒力质粒(pVA1)的同一个操纵子上^[18],理论上认为,这两个基因在共表达情况下才产生PirA和PirB毒素,此时这两者的相互作用才具有较高的细胞毒力^[19]。Yang等^[5]将嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*) HB310的pirA基因去除终止密码子后,通过柔性连接子linker与pirB基因连接重组并融合表

达了 PirAB-fusion 蛋白,同时共表达了 PirAB 蛋白;经针对大蜡螟(*Galleria mellonella*)的半数致死量(LD₅₀)验证,共表达的 PirAB 蛋白生物活性比 PirA/PirB 重组蛋白混合物强,PirAB-fusion 蛋白丧失了生物活性。在本研究中,在不去除 PirA 的终止密码子的前提下,联合表达 *pirA* 和 *pirB* 基因,得到的重组蛋白 PirAB 具有 17 kDa 的 PirA 蛋白和 50 kDa 的 PirB 蛋白,该联合表达蛋白理论上具有较高的细胞毒性,可为后期抗体的研发提供技术资料。

综上所述,本实验在最适诱导条件和高效纯化条件下获得了小批量高纯度的 PirA、PirB 重组蛋白,并首次共表达了 VP_{AHPND} 的 PirAB 蛋白,SDS-PAGE 电泳分析表明,表达的 3 种重组蛋白主要以可溶性形式存在,Western blot 分析证实该重组蛋白质具有良好的反应原性。此实验结果为下一步的抗体制备和致病机理研究提供了充足的实验材料,为 AHPND 的防控研究提供了实践基础。

参考文献

- [1] LIU F, LI S, YU Y, et al. Pathogenicity of a *Vibrio owensii* strain isolated from *Fenneropenaeus chinensis* carrying *pirAB* genes and causing AHPND [J]. *Aquaculture*, 2021, 530:735747.
- [2] LEE C T, CHEN I T, YANG Y T, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(34):10798-10803.
- [3] VICTORIO-DE LOS SANTOS M, VIBANCO-PÉREZ N, SOTO-RODRIGUEZ S, et al. The B subunit of *pirA*-B^{vp} toxin secreted from *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND is an amino sugar specific lectin [J]. *Pathogens*, 2020, 9(3):182.
- [4] 孙建宇. 荧光发光杆菌 TT01 菌株 *pirAB* 基因的克隆表达及杀虫谱研究[D]. 广州:中山大学, 2012.
- [5] YANG Q, ZHANG J, LI T, et al. PirAB protein from *Xenorhabdus nematophila* HB310 exhibits a binary toxin with insecticidal activity and cytotoxicity in *Galleria mellonella* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 148:43-50.
- [6] 郭笑笑, 杨晴, 刘淑琴, 等. 嗜线虫致病杆菌 PirAB 毒素对棉铃虫相关酶活性的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(7):1266-1274.
- [7] SIRIKHARIN R, TAENGCHAIYAPHUM S, SAN-GUANRUT P, et al. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp [J]. *PloS One*, 2015, 10(5):e0126987. DOI:10.1371/journal.pone.0126987.
- [8] JOSHI J, SRISALA J, TRUONG V H, et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. *Aquaculture*, 2014, 428/429:297-302.
- [9] FENG B, LIU H, WANG M, et al. Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2017, 2(6):278-285.
- [10] ZHANG D, BADER T J, LANGE M D, et al. Toxicity of recombinant PirA and PirB derived from *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 155:104886.
- [11] 张萌萌, 潘迎捷, 王永杰. 欧文氏弧菌毒力蛋白 PirAB 的原核表达与纯化[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(1):65-68.
- [12] 肖玲玲, 杨洁, 张瑞, 等. IPTG 浓度对大肠杆菌中重组 GroEL 表达的影响[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(2):140-144.
- [13] 柴政斌, 张更林, 王学政, 等. 融合蛋白 GST-PAD14 可溶性表达条件的优化及纯化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(3):404-408.
- [14] 杨晰朦, 陈香梅. 结核分枝杆菌 ESAT6-CFP10 融合蛋白的原核表达及其表达条件的优化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(3):286-292.
- [15] 叶彩燕. 一例对虾急性肝胰腺坏死症病原分离鉴定及 PirB 蛋白的功能分析[D]. 成都:四川农业大学, 2019.
- [16] LIN S J, HSU K C H, WANG H C. Structural insights into the cytotoxic mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* PirA (vp) and PirB (vp) toxins [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(12):373.
- [17] LIN S J, CHEN Y F, HSU K C, et al. Structural insights to the heterotetrameric interaction between the *Vibrio parahaemolyticus* *pirA*^{vp} and *pirB*^{vp} toxins and activation of the cry-like pore-forming domain [J]. *Toxins*, 2019, 11(4):233.
- [18] HAN J E, TANG K F, TRAN L H, et al. Phototransduction insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113:33-40.
- [19] SOTO-RODRIGUEZ S A, LOZANO-OLVERA R, MONTFORT G R C, et al. PirAB from *Vibrio parah-*

aemolyticus exhibits a binary toxin action with bactericidal activity and cytotoxicity in *Penaeus vannamei*

[J]. Preprints, 2022, 2022010200. DOI: 10. 20944/preprints202201. 0200. v1.

Prokaryotic Expression and Purification of VP_{AHPND} Virulence Protein PirAB

FAN Xianping^{1,2}, ZHANG Sheng¹, JIANG Ge², CAO Xiaohui², QIAO Yi², CHENG Jie², XU Juntian¹, HU Chuangxian³, SHEN Hui^{2* *}

(1. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu, 222000, China; 2. Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong, Jiangsu, 226007, China; 3. Jiangsu Agricultural Reclamation Golden Carp Fishery Company Limited, Yancheng, Jiangsu, 224500, China)

Abstract: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) is a new disease of shrimp. The pathogen of AHPND is a kind of *Vibrio* (VP_{AHPND}) carrying a binary toxin PirAB, which can infect shrimp with high mortality. In this study, the whole gene sequence of *pirAB* published by GenBank was used to design specific primers, and the target genes of *pirA*, *pirB*, and *pirAB* were obtained by PCR and cloned into the expression vector pET 21b (+) to construct prokaryotic expression systems of BL21-pET21b-*pirA*, BL21-pET21b-*pirB*, and BL21-pET21b-*pirAB*. The optimal expression conditions of recombinant protein were analyzed by optimizing the concentration of inducer, induction temperature, and induction time. The Ni magnetic beads were used to purify the recombinant protein, and its anti-genicity was analyzed by Western blot method. The results showed that the molecular weights of the recombinant proteins of PirA, PirB and PirAB were about 17 kDa, 50 kDa and (50 + 17) kDa, respectively, which were consistent with the expected size. The optimum induction conditions of recombinant protein were as follows: IPTG concentration was 0.01 mmol/L, PirA and PirAB were induced at 30°C for 24 h, and PirB was induced at 30°C for 4 h. The protein was expressed in a soluble form. The purified recombinant protein has a good reactivity, which can provide sufficient experimental materials for the next antibody preparation and AHPND pathogenesis research.

Key words: AHPND; *pirAB* genes; virulence protein; *Vibrio* parahaemolyticus; prokaryotic expression

责任编辑: 陆 雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>