

文章编号: 1674-7054(2021)03-0333-07



# 维氏气单胞菌 Cbl 蛋白的原核表达及纯化

张伊动, 马香, 李宏, 唐鸿倩, 刘柱, 唐燕琼

(海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228)

**摘要:** 维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)引起的细菌性疾病已威胁到鱼类养殖业的发展。Cbl(类 CysB 蛋白)是细菌硫代谢的重要调控因子之一。本研究选取 pET-28a 为 Cbl 的原核表达载体, 以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为宿主菌, 使用 IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactoside, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)诱导表达, 用 SDS-PAGE 凝胶电泳验证蛋白条带, 再用 BOSTER 的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量 Cbl 蛋白浓度, 寻找较适宜的蛋白表达条件。结果表明, 当诱导时间为 8 h, IPTG 终浓度为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>, 诱导温度为 15 °C, 咪唑洗脱浓度为 100 mmol·L<sup>-1</sup> 时, Cbl 蛋白质量浓度能达到 601.405 mg·L<sup>-1</sup>, 可满足后续实验要求。

**关键词:** Cbl; 载体构建; 原核表达; 蛋白纯化

**中图分类号:** R 284.2      **文献标志码:** A

**引用格式:** 张伊动, 马香, 李宏, 等. 维氏气单胞菌 Cbl 蛋白的原核表达及纯化 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(3): 333-339. DOI: [10.15886/j.cnki.rds wxb.2021.03.009](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rds wxb.2021.03.009)

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是一种革兰氏阴性兼性厌氧菌, 隶属于气单胞菌科、气单胞菌属<sup>[1]</sup>。有研究表明, 这种新兴的水生病原菌可以引起人类和动物(包括水生动物)的腹泻、伤口感染和出血性败血症<sup>[2-3]</sup>。它兼具肠毒素、III型分泌效应蛋白 AexU、组氨酸激酶 BvgS、丝氨酸蛋白酶、外膜蛋白和鞭毛等多种毒力因子<sup>[4-5]</sup>, 能给水产养殖业造成巨大的经济损失, 并对食品安全造成威胁<sup>[6-7]</sup>。例如: 养殖场的鲶鱼和黄颡鱼感染维氏气单胞菌后, 会大量死亡<sup>[8-9]</sup>。因此, 维氏气单胞菌引起的鱼类细菌性疾病是制约水产养殖发展的重要因素, 而解构维氏气单胞菌的抗逆性对维氏气单胞菌的疾病防治具有重要意义。类 CysB 蛋白 Cbl(CysB like protein)是 LysR 家族的转录调控因子。1995 年, 首次在大肠杆菌中发现了 *cbl* 基因, 它与 *cys* 调控子的转录调控因子 CysB 蛋白非常相似, 与 CysB 具有 40% 的氨基酸序列同源性<sup>[10]</sup>。在硫代谢中, Cbl 作为细胞内硫酸盐水平的传感器, 在体内和体外激活 tau 和 ssu 启动子, 控制牛磺酸和脂肪族磺酸盐的转运及脱硫所需的 *tauABCD* 和 *ssuEADCB* 的转录, 从而稳定细菌体内的硫酸盐水平<sup>[11-13]</sup>。Cbl 的功能与 CysB 高度同一, 目前对 Cbl 的研究较少, 但鉴于 CysB 现有的功能, 可以推断 Cbl 存在的潜在毒力控制、参与细菌体内氧化应激机制等重要功能<sup>[14-16]</sup>。因此, 本研究以维氏气单胞菌为研究对象, 对 Cbl 蛋白进行原核表达和纯化, 旨在为进一步揭示 Cbl 蛋白的功能和机制奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)C4 菌株、大肠杆菌 BL21(DE3)以及含 pET-28a 质粒的大肠杆菌 DH5α 均为课题组保存菌株。

**1.2 主要试剂与仪器** Bacteria DNA Extraction Kit、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit、FastPure

收稿日期: 2021-03-11      修回日期: 2021-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31772887)

第一作者: 张伊动(1996-), 女, 海南大学生命科学与药学院 2018 级硕士研究生. E-mail: [2802129536@qq.com](mailto:2802129536@qq.com)

通信作者: 唐燕琼(1968-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 植物病原细菌真菌的遗传机理及生物防控技术. E-mail: [990804@hainu.edu.cn](mailto:990804@hainu.edu.cn)

Plasmid Mini Kit、2 × Phanta Max Master Mix 以及 2 × Rapid Taq Master Mix 均购自 Vazyme 公司; 限制性内切酶(EcoRI-HF 和 HindIII-HF)及 Fast T4 DNA Ligase /Buffers 均购自 NEB 公司; 卡那霉素(Kan, 水溶, 储存的质量浓度为 50 g·L<sup>-1</sup>, 工作质量浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup>, -20 °C 保存)、异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG, 水溶, 储存浓度为 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, 工作浓度为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>, -20 °C 保存)、聚丙烯酰胺混合液(29 : 1, 体积比)、Tris、乙二胺四乙酸(EDTA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)以及 LB 培养基(w=1%NaCl, w=1% 蛋白胨和 w=0.5% 酵母提取物)均购自 Solarbio 公司。

Eppendorf Centrifuge 5418 高速台式离心机(Eppendorf 中国有限公司)、Life ECO-PCR 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司)、Bio-Rad MicroPulser 电穿孔仪(美国 Bio-Rad 公司)、HZQ-F100 振荡培养箱(哈尔滨市东联生化仪器有限公司)、SYNERGY-H1 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)、PowerPac™电泳仪(美国 Bio-rad 公司)以及 Typhoon FLA 9500 多功能生物分子成像仪(浙江德力西电器有限公司)。

**1.3 *cbl* 基因片段的扩增** 设计 *cbl* 基因扩增引物(表 1)。使用 Bacteria DNA Extraction Kit 提取维氏气单胞菌 C4 总 DNA, 以维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA 为模板, 利用 *cbl*-F 和 *cbl*-R 对 *cbl* 基因片段进行 PCR 扩增, 其片段大小为 948 bp。PCR 反应体系为 2 × Phanta Max Master Mix 25 μL, *cbl*-F(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, *cbl*-R(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, 基因组 DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL, 反应总体积为 50 μL。反应程序: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C 后延伸 10 min。PCR 完成后进行琼脂糖凝胶(w=0.5%)电泳鉴定, 再用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 纯化回收扩增的 DNA 片段。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequence

| 引物 Primers    | 核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence (5'→3') | 长度/bp Length |
|---------------|------------------------------------------|--------------|
| <i>cbl</i> -F | CCGGAATTCGTGAATTTTCAGCAGTTACG            | 29           |
| <i>cbl</i> -R | CCCAAGCTTCAAATCTGGAAGTCGAG               | 27           |

**1.4 重组原核表达载体的构建** 使用 FastPure Plasmid Mini Kit 提取 pET-28a 质粒, 再用 EcoRI-HF 和 HindIII-HF 对纯化回收的 DNA 片段和 pET-28a 质粒进行双酶切, 酶切产物使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 纯化回收后按一定比例(质粒 : 片段的摩尔比为 1 : 5)使用 Fast T4 DNA Ligase 过夜连接, 将扩增出的 *cbl* 基因连入 pET-28a 载体的 EcoRI(GAATTC) ~ HindIII(AAGCTT)位点之间。将连接产物通过电击转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 复苏后涂布于含卡那霉素 LB 平板, 过夜培养后挑菌验证, 阳性克隆子送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

**1.5 Cbl 蛋白的诱导表达** 将含有 pET-28a-Cbl 重组载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株接种至含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 °C 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 在 0.4 ~ 0.6 之间, 加入 IPTG 至终浓度为 100 μmol·L<sup>-1</sup>, 在 150 r·min<sup>-1</sup>、15 °C 条件下, 过夜诱导表达 12 h。然后将菌液冷冻离心(4 °C, 4 000 r·min<sup>-1</sup>)10 min, 用 10 mL 的 Tris-HCl(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris, 350 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)缓冲液重悬菌体。超声破碎仪设置: 超声时间 5 s, 间隙时间 7 s, 总时间 25 min, 温度 25 ~ 28 °C, 功率 35%。冰上超声破碎重悬的菌体后将破碎的菌体冷冻离心(4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup>)10 ~ 15 min, 分离得到沉淀和上清。提前取出镍柱, 用 20 mL Tris-HCl 缓冲液清洗 2 ~ 3 遍后关闭镍柱阀门, 将破碎上清注入镍柱中并封口, 置于冰上 150 r·min<sup>-1</sup> 孵育 1 h。打开镍柱阀门, 流尽孵育上清, 用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑洗脱杂蛋白, 100 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑收集目的 Cbl 蛋白, 500 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑清洗镍柱。最后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

**1.6 Cbl 蛋白纯化** 剪下合适大小的透析袋, 放入含有 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-2Na 的 w=2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液中煮 10 min, 去离子水清洗后放入 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-2Na 溶液中再次煮 10 min, 再次用去离子水清洗透析袋。将诱导表达的蛋白加入透析袋中, 用含有 φ=30% 甘油的 Tris-HCl 作为透析液于 4 °C 进行透析, 每

6 h 更换 1 次透析液, 共透析 12 h。取出透析袋中透析好的蛋白, SDS-PAGE 观察目的条带, 用 BOSTER 的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量 Cbl 蛋白质量浓度。

## 2 结果与分析

**2.1 pET-28a-Cbl 重组载体构建** 使用 Bacteria DNA Extraction Kit 提取维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA, 并用维氏气单胞菌特异性引物进行 PCR 验证, 维氏气单胞菌 C4 破碎菌体作为阳性对照。从图 1-A 可知, 提取的维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA 条带单一清晰无杂带, 大小与阳性对照相比一致, 约为 200 bp, 符合理论预期。而后经功能酶标仪检测维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA 浓度为  $672.76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 可用于后续实验。

将双酶切后的维氏气单胞菌 *cbl* 基因扩增片段和 pET-28a 质粒双酶切片段用 Fast T4 DNA Ligase 酶连, 电击转化法转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中并涂布于含有  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素的 LB 平板上进行筛选培养, 对平板上长出的单菌落使用 pET-28a 载体引物进行 PCR 验证。从图 1-B 可知, 挑取的阳

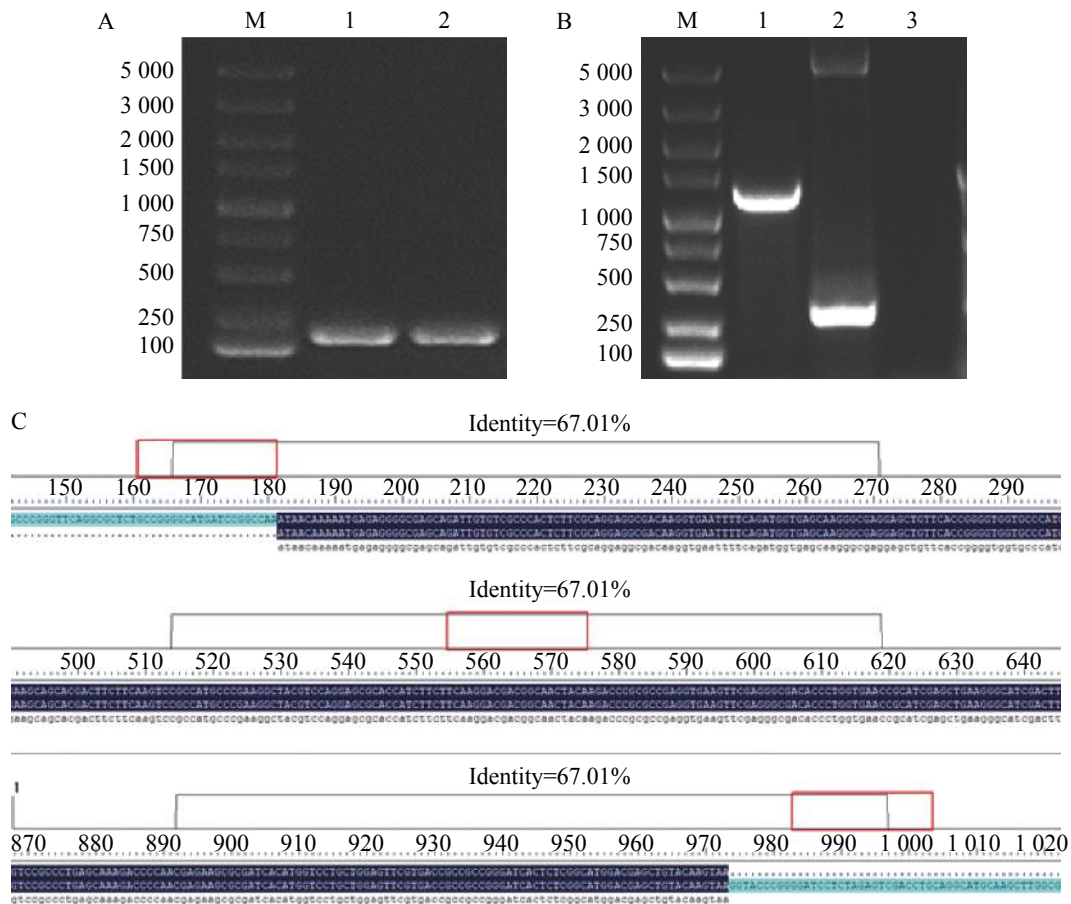


图 1 构建 pET-28a-Cbl 重组载体

A. 维氏气单胞菌 C4 基因组 DNA 验证 (M: DL5000 DNA Marker; 1: 使用维氏气单胞菌 C4 验证引物验证基因组 DNA; 2: 以维氏气单胞菌 C4 破碎菌液为模板的阳性对照); B. pET-28a-Cbl 重组载体验证 (M: DL5000 DNA Marker; 1: 使用 pET-28a 载体引物验证 pET-28a-Cbl 的扩增片段; 2: 以空载 pET-28a 质粒为模板的阳性对照; 3: 以 ddH<sub>2</sub>O 为模板的阴性对照); C. 软件 DNAMAN 序列比对。

Fig. 1 Construction of pET-28a-Cbl recombinant vector

A. *Aeromonas veronii* C4 genomic DNA verification (M: DL5000 DNA Marker; 1: Use *Aeromonas veronii* C4 verified primers to verify the genomic DNA; 2: Positive control with the fragmentized bacteria of *Aeromonas veronii* C4 as template); B. pET-28a-Cbl recombinant vector verification (M: DL5000 DNA Marker; 1: Use pET-28a vector primers to verify the amplified fragment of pET-28a-Cbl; 2: Positive control with pET-28a empty vector as template; 3: Negative control with ddH<sub>2</sub>O as template); C. DNAMAN software sequence alignment.



性克隆子的条带处于 1 000 ~ 1 500 bp 之间, 条带单一清晰无杂带, 且与以空载的 pET-28a 质粒作为模板的阳性对照相比相差约 948 bp, 符合理论预期, 说明阳性克隆子成功的将 *cbl* 基因片段连入 pET-28a 载体。

富集培养后提取质粒送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 进行分析, 结果如图 1-C 所示, 阳性克隆子序列与维氏气单胞菌 C4 基因组中 *cbl* 序列一致。进一步验证了成功构建原核重组表达质粒 pET-28a-Cbl。

**2.2 Cbl 蛋白的诱导表达** 将含有重组 pET-28a-Cbl 载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 于 37 °C 培养至  $OD_{600}$  为 0.4 ~ 0.6 后, 加入 IPTG 于 37 °C 诱导表达 2、4、6 h, 以未加 IPTG 诱导的 pET-28a-Cbl 以及加入 IPTG 的空载 pET-28a 作为对照, 对得到的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 Cbl 蛋白在上清和沉淀中的表达情况。从图 2 可见, 于 37 °C 条件下, 经 IPTG 诱导后, pET-28a-Cbl 在 35.35 kDa 左右有 1 条明显的特异性的蛋白条带, 并且条带浓度明显大于对照组, 且 2、4、6 h 这 3 个时间点的蛋白诱导量随着时间的增长而变大, 但是 Cbl 蛋白结构不稳定, 易出现错配的二硫键, 导致包涵体的形成, 因此, Cbl 蛋白大多在沉淀中表达, 在上清中只有少量表达。为了解决该问题, 在相同条件下加入 IPTG 后, 15 °C 低温诱导表达, 以 Tris-HCl 作为缓冲液超声破碎细胞, 破碎得到的上清蛋白使用镍柱纯化。使用不同浓度的咪唑(50、100、150、200、300、400、500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行梯度洗脱, 对得到的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。分析结果(图 3)表明: 经过低温诱导后, Cbl 蛋白在上清中表达量明显增加, 镍柱孵育后大小为 35.35 kDa, 带有 His 标签的 Cbl 蛋白成功与镍柱结合, 并且比较不同浓度咪唑洗脱得到的蛋白, 其中, 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱时能将大部分目的蛋白洗脱下来, 此时蛋白条带单一浓度较高, 能用于下一步实验。

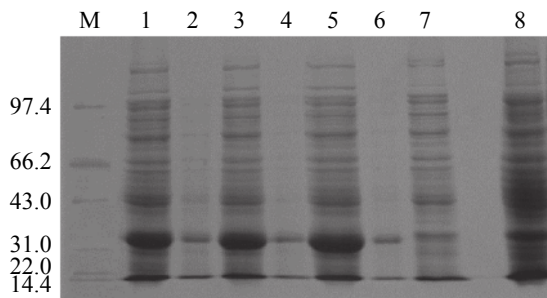


图 2 不同条件下 Cbl 蛋白的表达图谱

M: 低分子质量蛋白 Marker(14.4 ~ 97.4 kDa); 1: 诱导后培养 2 h 的沉淀; 2: 诱导培养后 2 h 的上清; 3: 诱导后培养 4 h 的沉淀; 4: 诱导后培养 4 h 的上清; 5: 诱导后培养 6 h 的沉淀; 6: 诱导后培养 6 h 的上清; 7: 空载 pET-28a 诱导后培养 2 h 的沉淀; 8: 未加 IPTG 诱导培养 2 h 的沉淀。

Fig. 2 Expression profile of Cbl protein under different conditions

M: Protein Marker (14.4kD-97.4 kDa); 1: The precipitation of the induced sample cultured for 2 h; 2: The supernatant of the sample cultured for induction for 2 h; 3: The precipitation of the sample cultured for induction for 4 h; 4: The supernatant of the sample cultured for induction for 4 h; 5: The precipitation of the sample cultured for induction for 6 h; 6: The supernatant of the sample cultured for induction for 6 h; 7: The precipitation of the sample containing pET-28a empty vector cultured for induction for 2 h; 8: The precipitation of the sample cultured for induction for 2 h without IPTG

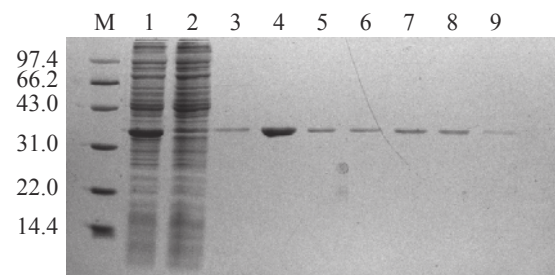


图 3 Cbl 蛋白的纯化图谱

M: 低分子质量蛋白 Marker(14.4 ~ 97.4 kDa); 1: 超声破碎后的上清; 2: 镍柱孵育后的过柱蛋白; 3: 50 mM 咪唑洗脱蛋白; 4: 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白; 5: 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白; 6: 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白; 7: 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白; 8: 400  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白; 9: 500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑洗脱蛋白。

Fig. 3 Purification map of Cbl protein

M: Protein Marker (14.4-97.4 kDa); 1: Supernatant after ultrasonic crushing; 2: Over-column proteins after Ni column incubation; 3: Protein eluted with 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 4: Protein eluted with 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 5: Protein eluted with 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 6: Protein eluted with 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 7: Protein eluted with 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 8: Protein eluted with 400  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole; 9: Protein eluted with 500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  imidazole.

**2.3 Cbl 蛋白纯化** 使用含  $\varphi=30\%$  甘油的 Tris-HCl 缓冲液作为透析液, 4 °C 过夜透析 Cbl 蛋白充分去除咪唑。取出透析蛋白, 用 BOSTER 的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒制作标准曲线, 测量 Cbl 蛋白  $OD_{562}$

值,进而根据标准曲线得到 Cbl 蛋白的浓度。制作的标准曲线如图 4 所示,横坐标表示蛋白的  $OD_{562}$ ,纵坐标表示蛋白质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,标准曲线  $R^2$  值=0.9676,表明标准曲线可信度高,透析所得蛋白  $OD_{562}=0.555$ ,根据公式  $y=1112x-237.74$ ,代入计算可得 Cbl 蛋白质量浓度为  $601.405\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 3 讨论

渔业在我国国民经济贸易中的作用日益增强,水产养殖业已经成为促进渔业可持续、快速、稳定发展的重要力量<sup>[17]</sup>。然而,鱼类细菌性疾病的频繁发生是制约水产养殖发展的重要因素<sup>[7]</sup>。近年来,维氏气单胞菌大规模爆发的病例越来越多。有报道称,维氏气单胞菌可感染淡水鱼<sup>[18-19]</sup>、两栖动物<sup>[20]</sup>和哺乳动物<sup>[2]</sup>,给养殖业造成严重的经济损失,并威胁食品安全。此外,人们也可能通过接触维氏气单胞菌污染的表面而感染,如被污染的家畜和家禽肉类和海产品,从而导致肠胃炎<sup>[21]</sup>。但是维氏气单胞菌致病机制复杂,其致病机理尚未研究透彻,治疗维氏气单胞菌引起的各种疾病显得至关重要。

Cbl 作为硫酸盐水平的感应器,在硫代谢途径中有着重要作用。在大肠杆菌中,迄今为止鉴定的 *ssi* 基因包括 *ssuEADCB* 和 *tauABCD* 操纵子,分别编码有机硫化物、脂肪族磺酸盐和牛磺酸摄取系统的,以及从各自底物中释放亚硫酸盐的氧化还原酶型酶<sup>[22]</sup>。*tau* 和 *ssu* 的表达仅在无无机硫酸盐的情况下诱导,且需要转录因子 Cbl 的存在<sup>[23]</sup>。尽管与 CysB 高度同源,但与 CysB 不同的是 Cbl 不需要诱导配体就能从目标启动子中激活转录,其功能受到硫酸同化途径中的第一个中间体腺苷 5-磷酸硫酸酯 (APS) 的负调控<sup>[24]</sup>。因此,*cbl* 介导的调节解释了大肠杆菌利用硫源的层次:半胱氨酸>硫酸盐>磺酸盐<sup>[25]</sup>。本实验室的前期研究表明,Cbl 与维氏气单胞菌  $\text{H}_2\text{S}$  的合成密不可分,而在细菌中, $\text{H}_2\text{S}$  参与了细菌对活性氧 (ROS 和抗生素诱导的氧化损伤的防御<sup>[26]</sup>。因此,Cbl 对维氏气单胞菌的氧化耐受也起着重要作用。

本研究成功构建了 Cbl 蛋白编码基因 *cbl* 的原核表达载体 pET-28a-Cbl,并根据 Cbl 与 CysB 蛋白的高同源性,参考 CysB 的蛋白表达条件<sup>[17]</sup>,摸索出了 Cbl 蛋白诱导表达和纯化的适宜条件。研究表明,Cbl 蛋白在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  时,主要在细菌裂解后沉淀中表达,易形成包涵体,所以对 Cbl 蛋白进行低温诱导,减少包涵体的形成。因此,得出 Cbl 蛋白诱导的适宜条件:诱导时间为 8 h, IPTG 终浓度为  $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,诱导温度为  $15\text{ }^\circ\text{C}$ 。Cbl 蛋白经由 Ni 柱纯化后主要分布于  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑的洗脱液中,纯化得到的 Cbl 蛋白条带清晰单一,透析后蛋白浓度较高,能满足后续功能研究实验的要求。

本研究对 Cbl 进行了原核表达载体的构建以及蛋白表达纯化,最后得到理想的 Cbl 蛋白,为下一步进行 Cbl 蛋白的功能及其分子机制研究奠定了基础,也为维氏气单胞菌氧化耐受抗逆性的研究提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] 曹欣,唐燕琼,李宏,等. Flag-ALD 融合载体构建及蛋白表达[J]. 热带生物学报, 2020, 11(2): 132 - 137.
- [2] BHOWMICK U D, BHATTACHARJEE S. Bacteriological, Clinical and virulence aspects of *Aeromonas*-associated diseases in humans [J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2018, 67(2): 137 - 149.
- [3] LI T, WANG Z, HAN H, et al. Dual Antibacterial activities and biofilm eradication of a marine peptide-N6NH<sub>2</sub> and its analogs against multidrug-resistant *Aeromonas veronii* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 1 - 28.
- [4] SONG M F, KANG Y H, ZHANG D X, et al. Immunogenicity of extracellular products from an inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in Koi, *Cyprinus Carpio* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 81: 176 - 181.
- [5] REYES-BECERRIL M, ANGULO C, ASCENCIO F. Humoral immune response and TLR9 gene expression in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) experimentally exposed to *Aeromonas veronii* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 289 - 296.

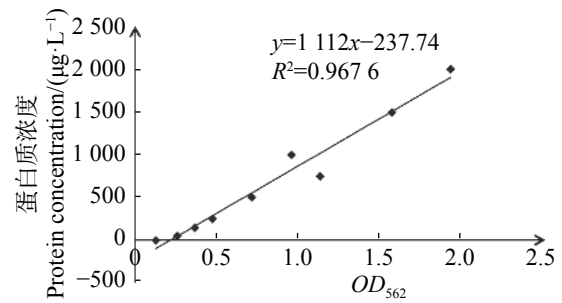


图4 蛋白浓度标准曲线

Fig. 4 Standard curve of protein concentration

- [6] HOAI T D, TRANG T T, VAN TUYEN N, et al. *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam [J]. *Aquaculture*, 2019, 513: 734425.
- [7] HUANG H, ZHOU P, CHEN P, et al. Alteration of the gut microbiome and immune factors of grass carp infected with *Aeromonas veronii* and screening of an antagonistic bacterial strain (*Streptomyces flavotricini*) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 143: 104092.
- [8] SILVER A C, WILLIAMS D, FAUCHER J, et al. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* Group Revealed by Host Interaction and DNA Sequence Data [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e16751.
- [9] MOLINARI L M, DE OLIVEIRA SCOARIS D, PEDROSO R B, et al. Bacterial Microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system [J]. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 2003, 25(2): 267 – 271.
- [10] IWANICKA-NOWICKA R, HRYNIEWICZ M. A new gene, Cbl, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* Cys Regulon [J]. *Gene*, 1995, 166(1): 11 – 17.
- [11] VAN DER PLOEG J R, IWANICKA-NOWICKA R, BYKOWSKI T, et al. The *Escherichia coli* ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(41): 29358 – 29365.
- [12] VAN DER PLOEG J R, IWANICKA-NOWICKA R, KERTESZ M A, et al. Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the TauABCD operon and other sulfate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(24): 7671 – 7678.
- [13] VAN DER PLOEG J R, EICHHORN E, Leisinger T. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli* [J]. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(1/2): 1 – 8.
- [14] IWANICKA-NOWICKA R, ZIELAK A, COOK A M, et al. Regulation of sulfur assimilation pathways in *Burkholderia cenocepacia*: Identification of transcription factors CysB and SsuR and their role in control of target genes [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 1675 – 1688.
- [15] ÁLVAREZ R, NEUMANN G, FRÁVEGA J, et al. CysB-dependent upregulation of the *Salmonella typhimurium* CysJIIH operon in response to antimicrobial compounds that induce oxidative stress [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 458(1): 46 – 51.
- [16] MIRONOV A, SEREGINA T, NAGORNYKH M, et al. Mechanism of H<sub>2</sub>S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(23): 6022 – 6027.
- [17] GUI J F, ZHU Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in Aquaculture Animals [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(15): 1751 – 1760.
- [18] LI T, YANG B, SUN Y, et al. *Aeromonas veronii* infection in commercial freshwater fish: A potential threat to public health [J]. *Animals*, 2020, 10(4): 608.
- [19] GONZÁLEZ-SERRANO C J, SANTOS J A, GARCÍA-LÓPEZ M L, et al. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(3): 414 – 419.
- [20] PEARSON M D, HIRONO I, AOKI T, et al. Virulence properties of motile *Aeromonas* isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(3): 185 – 193.
- [21] PUND R P, THEEGARTEN D. The Importance of *Aeromonas* as a Human Pathogen [J]. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2008, 51(5): 569 – 576.
- [22] VAN DER PLOEG J R, WEISS M A, SALLER E, et al. Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: A gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(18): 5438 – 5446.
- [23] MENG X, WOLFE S A. Identifying DNA sequences recognized by a transcription factor using a bacterial one-hybrid system [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 30 – 45.
- [24] BYKOWSKI T, VAN DER PLOEG J R, IWANICKA-NOWICKA R, et al. The switch from inorganic to organic sulphur assimilation in *Escherichia coli*: Adenosine 5'-Phosphosulphate (APS) as a signaling molecule for sulphate excess [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(5): 1347 – 1358.
- [25] STEC E, WITKOWSKA-ZIMNY M, HRYNIEWICZ M M, et al. Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: Crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 364(3): 309 – 322.
- [26] SHATALIN K, SHATALINA E, MIRONOV A, et al. H<sub>2</sub>S: A universal defense against antibiotics in bacteria [J]. *Science*, 2011, 334(6058): 986 – 990.

## Prokaryotic Expression and Purification of Cbl Protein from *Aeromonas veronii*

ZHANG Yidong, MA Xiang, LI Hong, TANG Hongqian, LIU Zhu, TANG Yanqiong  
(College of Life Science and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Bacterial diseases caused by *Aeromonas veronii* have threatened the development of fish production. And Cbl (CysB like protein) is one of the important regulatory factors of bacterial sulfur metabolism. *Escherichia coli* BL21 (DE3) was selected as the prokaryotic expression vector for Cbl, and cultured added with IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside) for culture to induce the expression of Cbl. The protein samples were run on SDS-PAGE gel electrophoresis to verify the protein bands of Cbl, and then the concentration of Cbl was determined with Boster's BCA protein assay kit. The results showed that Cbl was successfully purified, and that the concentration of Cbl was up to  $601.405 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , which meets the requirements for subsequent experiments, when the induction time was 8h, the final IPTG concentration was  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the induction temperature was  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  and the Imidazole concentration in the elution buffer was  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Keywords:** Cbl; vector construction; prokaryotic expression; protein purification

(责任编辑:郑继平 责任编辑:潘学峰)