

文章编号: 1674-5566(2017)02-0183-06

DOI:10.12024/jsou.20160401739

白斑综合征病毒(WSSV)基因 VP28 原核表达与检测

张正阳¹, 张春莉², 施定基³, 贾晓会¹, 贾睿¹, 何培民¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, 60438 Frankfurt am Main, Germany; 3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: VP28 是对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)的囊膜蛋白。将 VP28 基因序列密码子优化后合成, 经限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 酶切后, 按正确的阅读框顺序插入到 pET-28a(+) 表达载体上。重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经质粒双酶切、测序鉴定后成功地构建了 VP28 基因原核表达载体 pET-28a-VP28。转化菌经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 显示含有与预期大小一致的约 30 ku 蛋白带, 主要以包涵体形式表达。采用 Ni-IDA-Sepharose CL-6B 亲和层析柱对重组蛋白进行纯化, 获得了纯度为 95% 的大肠杆菌重组蛋白 VP28。该纯化蛋白作为绝对定量 Western 的标准品, 梯度稀释建立标准曲线, 以定量检测转基因鱼腥藻 7120 中的 VP28 绝对表达量。实验结果表明, 大肠杆菌 BL21(DE3) 表达的重组蛋白 VP28 与鱼腥藻 7120 中表达的 VP28 分子量基本相同, 纯化后的大肠杆菌重组蛋白梯度稀释作为绝对定量 Western 标准曲线, 计算出转基因鱼腥藻 7120 在培养第 17 天时, VP28 的表达量最大, 为 5.14 μg/mL, 占转基因鱼腥藻 7120 总蛋白浓度的 1.45%。这不仅对转基因鱼腥藻的高效培养具有重要意义, 也为日后确定投喂对虾口服疫苗有效剂量防治白斑综合征奠定了基础。

关键词: 对虾; 白斑综合征病毒(WSSV); VP28; 大肠杆菌; 鱼腥藻 7120; 定量免疫印迹

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)自 1992 年在中国台湾被发现以来, 相继在中国大陆、泰国、印度、法国、美国、韩国、日本等地暴发^[1-6], 给世界各国对虾养殖业造成了严重的经济损失^[7-8]。WSSV 不仅可以感染对虾, 还可以感染淡水螯虾、龙虾、螃蟹等海洋甲壳类动物^[9], 3~10 d 内可造成对虾 100% 死亡^[10]。WSSV 的核酸为一大的双链环状 DNA, 分子长度为 305 kbp, 约有 181 个开放阅读框^[11]。目前已得到中国大陆株、台湾株、韩国株和泰国株四株 WSSV 的全基因组序列^[11-14]。虽然关于 WSSV 的研究仍在不断发展, 但是 WSSV 的致病机理至今尚未清楚, 因此仍没有针对病毒有效的阻断或防治手段, 所以早期预防显得十分重要。

2000 年, VENEGAS 等^[15]发现感染 WSSV 后存活下来的虾再次用 WSSV 攻毒, 存活率会大大提高, 与免疫反应具有相似性。2001 年, HULTEN

等^[16]证明 VP28 蛋白在感染宿主的过程中起着关键性的作用。2004 年, WITTEVELDT 等^[17]首次将大肠杆菌表达的 VP28 蛋白饲喂对虾, 再攻毒, 明显提高了成活率。此后 VP28 被多次证明可以保护对虾免受 WSSV 的感染, 也先后在多种表达系统中表达。而蓝藻作为对虾的开口饵料具有重组表达 VP28 口服疫苗的优势。JIA 等^[18]将表达 VP28 的鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120) 作为口服疫苗投喂仔虾后攻毒, 成活率为 68%。说明转 VP28 基因的蓝藻可以作为幼虾的口服疫苗, 可以使对虾具有抵御 WSSV 的能力。

目前为止有关转基因蓝藻的高密度表达培养和外源基因表达规律方面的研究报道不多, 所以针对外源基因表达量的定量研究显得尤为重要。由于大肠杆菌和蓝藻同为原核表达系统, 所以我们构建大肠杆菌原核表达载体, 重组表达 VP28 蛋白, 纯化后作为定量 Western 的标准品,

收稿日期: 2016-04-14 修回日期: 2016-12-02

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2014AA093506); 上海市科委项目(16391903500)

作者简介: 张正阳(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为藻类分子生物学。E-mail: zzybingo@126.com

通信作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

梯度稀释建立标准曲线,以此来测定转 *VP28* 基因蓝藻——鱼腥藻 7120 中 *VP28* 蛋白的绝对表达量。期望在蛋白水平上确定转 *VP28* 基因鱼腥藻 7120 的表达情况,为确定后续投喂口服疫苗的有效剂量和高效表达培养奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

转 *VP28* 基因鱼腥藻 7120 由中国科学院植物研究所提供。Bradford 蛋白定量试剂盒、卡那霉素购自上海生工;克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21 (DE3)、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、2 \times PCR Master Mix、IPTG 均购自天根生化科技(北京)有限公司;pET-28a(+)表达载体购自上海中科新生命公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP 二抗购自北京全式金生物有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 表达载体 pET-28a-*VP28* 的构建

由于 *VP28* 的 5' 端是个疏水的跨膜区,并含有一个预测的信号肽,所以将 *VP28* 基因序列密码子优化后合成:ATGGATTTGTCCTTACCCTGTC CGTAGTTAGCGCCATCCTGGCCATCACAGCGGTG ATTGCGGTCTTTATTGTTATCTTTTCGTTATCACAAAC ACCGTGACTAAAACCATTGAAACCCATACTGATA ACATTGAAACCAATATGGATGAAAACCTGCGTAT TCCGGTTACGGCCGAAGTGGGGTCAGGCTATTTCA AAATGACGGATGTCTCATTTCGATAGCGATACCTT AGGGAAAATTAAGATCCGTAACGGTAAAAGCGA TGCCGAGATGAAAGAAGAAGACGCGGACTTAGT TATTACGCCCGTCGAAGGCCGTGCACTGGAAGTT ACCGTAGGTCAGAATCTGACTTTTGAAGGCACGT TTAAAGTGTGGAATAATACGAGCCGTAATAATCAA CATTACCGGTATGCAGATGGTACCGAAAATTAAT CCAAGTAAAGCATTTCGTCGGTTCGAGCAATACGA GTAGCTTTACGCCCGTTTCAATCGACGAGGATGA GGTGGGCACCTTCGTTTGTGGTACCACCTTCGGAG CGCCGATCGCCGCGACGGCGGGCGGTAATCTGTT CGATATGTACGTTTCATGTACATATTCGGGCACGG AGACAGAATAA。

根据 *VP28* 基因 CDS 序列和 pET-28a(+) 表达载体的多克隆位点,设计特异性 PCR 引物:正向引物 *VP28*-F1:5' CATATCCATATGGATTTGTC

CTTTACCCTGTC 3';反向引物 *VP28*-R1:5' AATCACCTCGAGTTATTTCTGTCTCCGTGCCCGAATA 3';其中 F1 中含有 *Nde* I 酶切位点;R1 中含有 *Xho* I 酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

根据说明书要求,采用 2 \times PCR Master Mix (天根)50 μ L 反应体系扩增目的片段。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,29 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min;4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后,取 10 μ L 进行 1.0% Agarose 电泳鉴定。

鉴定正确后,采用 DNA 纯化试剂盒纯化。按照常规分子克隆方法,将 *VP28* PCR 产物、pET-28a(+)载体进行 *Nde* I、*Xho* I 双酶切。DNA 纯化试剂盒纯化回收酶切产物,T4 DNA 连接酶 22 $^{\circ}$ C 连接 16 h。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 50 μ g/mL Kana 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。菌落 PCR 筛选阳性克隆,再提取重组质粒进行酶切鉴定并送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.2.2 pET-28a-*VP28* 在大肠杆菌中的表达

将验证正确的重组质粒 pET-28a-*VP28* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取转化平板上的单克隆接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 3 mL LB 培养液的试管中,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振摇过夜;次日按 1:100 接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 30 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振摇至菌体 OD₆₀₀ 为 0.4 (约 2 h),加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振摇 4 h,诱导表达;取出 1 mL 培养物,将表达菌体重悬于 400 μ L Ni-IDA Binding-Buffer(20 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,pH 8.0);重悬液进行超声波破碎(冰浴中进行):功率 100 W,工作 4 s,间歇 8 s,共 10 min;超声破碎液 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 20 min,取 10 μ L 上清液加入等量的 2 \times 上样缓冲液,沉淀用 400 μ L 1 \times 上样缓冲液重悬后取 5 μ L,恒压 150 V 进行 12% SDS-PAGE。

1.2.3 *VP28*-His 包涵体蛋白的纯化及 SDS-PAGE 检测

将 1 L 诱导表达的培养菌体沉淀用 20 mL Ni-IDA Binding-Buffer 重悬后,超声破碎(功率 200 W,工作 4 s,间歇 8 s,共 20 min),4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 20 min,收集沉淀;沉淀连续用 2、3、4 和 6 mol/L 尿素重悬后充分溶解,4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心

15 min,收集沉淀;向沉淀中加入 50 mmol/L Tris-HCl,重悬后充分溶解,4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,收集沉淀;再向沉淀中加入 8 mol/L 尿素,重悬后充分溶解,4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,取上清;利用 Biologic LP 层析系统,上清液以 0.5 mL/min 流速上样至 Ni-IDA Binding-Buffer 预平衡的 Ni-IDA -Sepharose CL-6B 亲和层析柱;用 Ni-IDA Binding-Buffer 以 0.5 mL/min 流速冲洗,至流出液 OD₂₈₀ 到达基线;连续用含有 10、20、50 和 250 mmol/L 咪唑的 Ni-IDA Washing-Buffer(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl,pH 8.0)以 1 mL/min 流速冲洗,至流出液 OD₂₈₀ 到达基线;洗脱目的蛋白,收集流出液;进行 12% SDS-PAGE 分析。

1.2.4 转基因鱼腥藻 7120 中 VP28 表达量的定量检测

将纯化和筛选后的转基因鱼腥藻 7120 以 1:50 的比例接种,设置 3 个平行。分别采集 3 个批次的转基因鱼腥藻 7120 接种后第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23 天的藻液,使用分光光度计测定其 OD₇₅₀ 值,绘制生长曲线。同时冻融法提取藻样的总蛋白,Bradford 法测定总蛋白浓度后 -80 ℃ 保存,用以测定不同时期藻体中 VP28 蛋白的表达量。

大肠杆菌中表达并纯化的重组 VP28 蛋白分别上样 0.05、0.1、0.25、0.5、1 和 2 μg,作为定量 Western 的标准曲线。一抗为 1:10 000 的本实验室制备的抗 VP28 多肽单克隆抗体,二抗为 1:5 000 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体。使用 ChemiDoc MP Imaging System(Bio-Rad) 检测条带发光信号强度,Image Lab 软件计算蓝藻中重组表达的 VP28 的含量。转 VP28 鱼腥藻 7120 中表达的 VP28 蛋白与标准品 pET-28a-VP28 进行比较定量。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-28a-VP28 的构建

经琼脂糖凝胶电泳检测,重组质粒大小为 5 910 bp,经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切后,分子量大小为 5 289 bp 和 621 bp,与预期大小一致,结果表明重组质粒构建成功(图 1)。为确保序列的正确性,经双酶切验证的重组质粒送至上海生工生物工程有限公司测序,测序结果显示 VP28 序列正确。

2.2 重组蛋白的诱导表达与检测

蛋白质分子量预测显示,VP28-His 融合蛋白预期分子量约为 30 ku 左右。SDS-PAGE 检测结果显示,分子量大小与预期一致(图 2),并且 VP28 主要以包涵体的形式表达(图 3)。

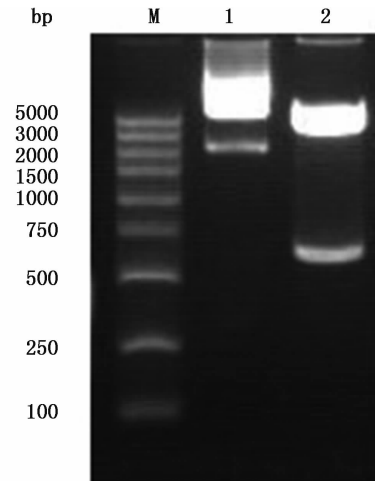


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 1 Electrophoretogram of agarose gel detection

M. DNA 分子量标准; 1. 重组质粒 pET-28a-VP28(5 910 bp); 2. pET-28a-VP28 *Nde* I、*Xho* I 双酶切产物

M. DNA marker; 1. pET-28a-VP28 recombinant plasmid (5 910 bp); 2. pET-28a-VP28 *Nde* I and *Xho* I double digestion products

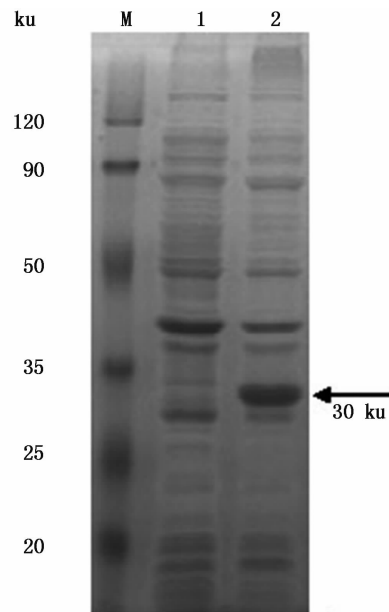


图 2 SDS-PAGE 检测 pET-28a-VP28 的诱导表达

Fig. 2 pET-28a-VP28 induced expression detection

M. 蛋白质分子量标准; 1. 未诱导全菌; 2. 诱导全菌; 箭头指示 VP28-His 融合蛋白

M. Protein marker; 1. Total protein of non-induced pET-28a-VP28; 2. Total protein of induced pET-28a-VP28 vector; Arrows indicate VP28-His fusion protein

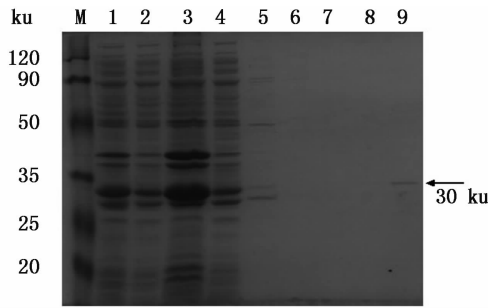


图3 SDS-PAGE 检测 VP28-His 包涵体纯化

Fig. 3 SDS-PAGE detection of VP28-His inclusion body purification

M. 蛋白质分子量标准; 1. 全菌; 2. 破碎后上清; 3. 破碎后沉淀; 4. 流出液; 5. 结合缓冲液洗脱; 6. 10 mmol/L 洗脱缓冲液洗脱; 7. 20 mmol/L 洗脱缓冲液洗脱; 8. 50 mmol/L 洗脱缓冲液洗脱; 9. 250 mmol/L 洗脱缓冲液洗脱。箭头指示 VP28-His 融合蛋白

M. Protein marker; 1. Total protein of induced pET-28a-VP28; 2. Supernatant protein of induced pET-28a-VP28; 3. Pellet protein of induced pET-28a-VP28; 4. Effluent; 5. Elution with Binding Buffer; 6. Elution with Washing Buffer (10 mmol/L); 7. Elution with Washing Buffer (20 mmol/L); 8. Elution with Washing Buffer (50 mmol/L); 9. Elution with Washing Buffer (250 mmol/L). Arrows indicate VP28-His fusion protein

2.3 包涵体蛋白的纯化与检测

融合蛋白包涵体经尿素洗涤、溶解后,利用 Biologic LP 层析系统,将上清液通过镍琼脂糖亲和层析柱 (Ni-IDA -Sepharose CL-6B) 纯化,经结合缓冲液和含有 10、20、50 和 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱,最终获得目的蛋白(图 3), SDS-PAGE 检测其纯度为 95%。

2.4 不同生长时期转基因鱼腥藻 7120 中 VP28 表达量、总蛋白变化和生长曲线

转 VP28 鱼腥藻 7120 中的 VP28 表达量通过使用 ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) 的 Image Lab 5.2 软件建立标准曲线(图 4)进行计算。结果显示转 VP28 鱼腥藻 7120 在培养第 17 天表达量最高,为 5.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 占总蛋白浓度的 1.45% (图 5a)。总蛋白浓度第 15 天最高,为 365.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 5b), 培养第 21 天生长量最大, OD_{750} 值为 1.25 (图 5c)。

3 讨论

对虾已成为人类开发海洋生产食物的首选对象之一,虽然我国的对虾产量已居全球前列,但是由于病害造成的损失也是名列前茅,其中危

害最严重的是白斑综合征病毒(WSSV)。多年来只能改养抗病强的品种、筛选无病毒的虾苗、改善养殖措施和环境等,减少 WSSV 的感染。一旦感染,尚未见到在规模养殖中应用有效防治的药物,这已成为世界难题。将 WSSV 重组囊膜蛋白导入对虾体内防控 WSSV 的策略,成为近年研究的热点,其中尤以 WSSV 主要囊膜蛋白 VP28 研究居多。

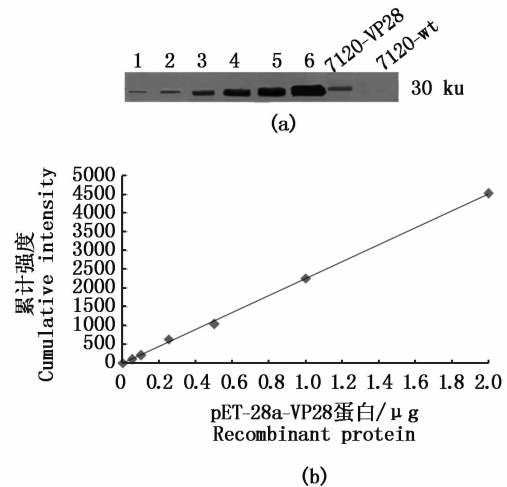


图4 定量 Western Blotting 标准曲线

Fig. 4 The standard curve of quantitative Western Blotting

1. 已纯化重组蛋白 0.05 μg ; 2. 已纯化重组蛋白 0.1 μg ; 3. 已纯化重组蛋白 0.25 μg ; 4. 已纯化重组蛋白 0.5 μg ; 5. 已纯化重组蛋白 1 μg ; 6. 已纯化重组蛋白 2 μg ; 7120-VP28. 转 VP28 鱼腥藻 7120; 7120-wt. 野生型鱼腥藻 7120

1. purified pET-28a-VP28 protein 0.05 μg ; 2. purified pET-28a-VP28 protein 0.1 μg ; 3. purified pET-28a-VP28 protein 0.25 μg ; 4. purified pET-28a-VP28 protein 0.5 μg ; 5. purified pET-28a-VP28 protein 1 μg ; 6. purified pET-28a-VP28 protein 2 μg ; 7120-VP28. recombinant cyanobacteria with VP28 gene; 7120-wt. 7120 wild type

蓝藻作为光合自养的原核生物,易于进行遗传操作,且多数不含内毒素,含蛋白酶较少,还可以作为对虾幼体时期的开口饵料,使蓝藻作为 VP28 蛋白的表达系统具有天然的优势。虽然已在丝状体蓝藻——鱼腥藻 7120 中成功表达了 VP28 基因,但是有关转 VP28 基因鱼腥藻 7120 的高密度表达培养和 VP28 表达规律方面的研究并不深入。而定量检测 VP28 的表达量是提高表达率、探索表达规律和最适诱导表达条件的基础,所以本文构建大肠杆菌重组质粒 pET-28a-VP28 原核表达 VP28 蛋白,经 IPTG 诱导, Ni-IDA-

Sepharose CL-6B 亲和层析柱纯化,获得了纯度为 95% 的目的蛋白。已纯化重组蛋白分别上样 0.05、0.1、0.25、0.5、1 和 2 μg ,作为横坐标,Chemi-Doc MP Imaging System 成像仪检测的信号

累计强度作为纵坐标,制作绝对定量 Western 的标准曲线,通过标准曲线来检测待测转基因鱼腥藻 7120 的 VP28 蛋白的绝对表达量。

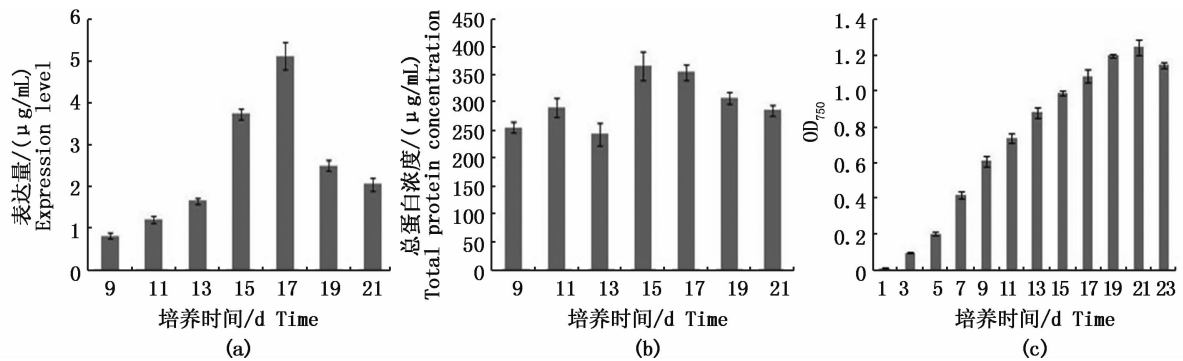


图5 不同生长时期转基因鱼腥藻 7120 中 VP28 表达量、总蛋白浓度和生长曲线的变化

Fig. 5 The expression level of VP28, protein concentration and growth curve of transgenic strain in different periods

实验结果表明,大肠杆菌表达的重组蛋白与鱼腥藻 7120 中表达的 VP28 分子量基本相同,纯化后的大肠杆菌重组蛋白梯度稀释作为绝对定量 Western 标准曲线,计算出转基因鱼腥藻 7120 随着时间的增长,VP28 表达量逐渐增加,直至第 17 天达到最大表达量,为 5.14 $\mu\text{g/mL}$,占总蛋白的 1.45%。通过与总蛋白和生长曲线对比可以发现,此时既不是生长量最大(第 21 天),也不是总蛋白浓度最大(第 15 天),但却是 VP28 表达量最高的时期。由此可见,表达量和生长量以及总蛋白均不是协同关系,这有可能是因为此时的叶绿素含量增加,总蛋白加快合成从而影响了 VP28 蛋白的表达率。生长后期表达量下降可能是因为培养密度过高,培养液不足造成的。所以研究表达规律,确定其最大表达量的生长期,定期更换培养液,合理优化培养密度是十分必要的。绝对定量方法的建立不仅对转基因蓝藻的高效培养具有重要意义,也为日后确定投喂口服疫苗有效剂量防治白斑综合征奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZHAN W B, WANG Y H, FRYER J L, et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1998, 10(4): 405-410.
- [2] LO C F, LEU J H, HO C H, et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in Penaeid shrimps using polymerase chain reaction [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 25(1/2): 133-141.
- [3] KARUNASAGAR I, OTTAS K, KARUNASAGAR I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India [J]. Aquaculture, 1997, 153(1/2): 9-13.
- [4] LIGHTNER D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp [M]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996: 1-15
- [5] PARK J H, LEE Y S, LEE S, et al. An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 34(1): 71-75.
- [6] INOUE K, MIWA S, OSEKO N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus [J]. Fish Pathology, 1994, 29(2): 149-158.
- [7] ESCOBEDO-BONILLA C M, ALDAY-SANZ V, WILLE M, et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(1): 1-18.
- [8] LIGHTNER D V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106(1): 110-130.
- [9] HAQ M B, VIGNESH R, SRINIVASAN M. Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: a review [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, 2(1): 73-77.
- [10] PRADEEP B, RAI P, MOHAN S A, et al. Biology, host range, pathogenesis and diagnosis of White spot syndrome virus [J]. Indian Journal of Virology, 2012, 23(2): 161-174.

- [11] YANG F, HE J, LIN X H, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [12] TSAI M F, LO C F, VAN HULTEN M C W, et al. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus [J]. *Virology*, 2000, 277(1): 92-99.
- [13] CHAI C Y, YOON J, LEE Y S, et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of a white spot syndrome virus isolated from Pacific white shrimp [J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(5): 695-699.
- [14] VAN HULTEN M C W, WITTEVELDT J, PETERS S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22.
- [15] VENEGAS C A, NONAKA L, MUSHIAKE K, et al. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(2): 83-89.
- [16] VAN HULTEN M C W, WITTEVELDT J, SNIPPE M, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp [J]. *Virology*, 2001, 285(2): 228-233.
- [17] WITTEVELDT J, VLAK J M, VAN HULTEN M C W. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 571-579.
- [18] JIA X H, ZHANG C L, SHI D J, et al. Oral administration of *Anabaena*-expressed VP28 for both drug and food against white spot syndrome virus in shrimp [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 1001-1009.

Prokaryotic gene expression and detection of white spot syndrome virus (WSSV) VP28

ZHANG Zhengyang¹, ZHANG Chunli², SHI Dingji³, JIA Xiaohui¹, JIA Rui¹, HE Peimin¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, 60438 Frankfurt am Main, Germany; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: VP28 is the envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV). After the codon optimization synthesis VP28 gene sequence, and enzyme digestion by restriction enzymes *Nde* I, *Xho* I, inserted the correct reading frame sequence into the expression vector—pET-28a(+). After the recombinant plasmid into *E. coli* BL21 (DE3) was digested by double enzyme and sequencing, it was confirmed that we have successfully constructed VP28 genetic prokaryotic expression vector—pET-28a-VP28. The transferred strain induced by IPTG, SDS-PAGE showed that contains the expected size of about 30 ku protein band, which was mainly expressed in inclusion body form. The recombinant protein was purified by Ni-IDA-Sepharose CL-6B affinity chromatography column and we got the purity of 95% protein finally. Gradiently dilute the purified protein as the quantitative standard curve of Western blotting, to quantify the amount of VP28 expression in transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120. The experiment results showed that the recombinant protein and VP28 expressed in *Anabaena* sp. PCC 7120 had the same molecular weight. Use the purification of recombinant protein as a quantitative western blotting standard curve, calculate the expression of VP28 in transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120. The largest amount was 5.14 μg/mL, on 17th day, accounting for 1.45% of the total protein concentration. This is not only of great significance to efficient cultivation of transgenic cyanobacteria, but also a foundation to determine the effective dosage of oral vaccine for prawn to prevent and cure white spot syndrome in the future.

Key words: shrimp; white spot syndrome virus (WSSV); VP28; *Escherichia coli*; *Anabaena* sp. PCC 7120; quantitative Western blotting