

鲤鱼生长激素和对虾白斑病毒囊膜蛋白 VP28 的融合表达及功能研究

韩建山 龙 燕 孟小林 徐进平 鲁 伟 王 健

(武汉大学病毒学国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 鲤鱼生长激素 GH 是鲤鱼生长腺体分泌并促进鲤鱼生长的一种分泌蛋白。对虾白斑综合病毒(WSSV) VP28 蛋白为囊膜蛋白, 是病毒感染宿主的必需因子。根据 *gh* 和 *vp28* 的上下游序列, 分别设计合成两对引物, PCR 扩增 *gh* 和 *vp28* 基因, 将基因 *gh* 和 *vp28* 按先后次序融合后插入穿梭质粒 pPIC6αC 多克隆位点, 构建成重组分泌表达穿梭质粒 pPIC6αG(*gh*+*vp28*), 用 *Bst*X¹ 单酶切穿梭质粒 pPIC6αG(*gh*+*vp28*) 线性化, 转化毕赤酵母 X33。重组菌株 30℃ 甲醇诱导, 实现在酵母中的融合分泌表达, 获得融合蛋白。表达产物经 SDS-PAGE 检测和 Western Blot 印迹鉴定, 显示与预期大小 66kD 相吻合的融合蛋白带。用 Ni²⁺-柱纯化后的基因工程蛋白注射螯虾进行蛋白生物功能测试, 结果表明该蛋白获得了促螯虾生长和抗 WSSV 感染的双重功效。

关键词: 鲤鱼生长激素(GH); 对虾白斑综合病毒(WSSV) VP28; *gh*+*vp28*; 毕赤酵母; 促生长; 抗病毒

中图分类号: Q591.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)03-0308-06

鲤鱼生长激素(Growth hormone, GH)是由鲤鱼脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链构成的多肽激素。主要的生理学功能是: 促进生长发育, 调节渗透压和促进生殖^[1]。1985年, Sekin 首先在大肠杆菌中表达了鱼生长激素^[2], 同年, 朱作言等首先报道了生长迅速的转生长激素基因鱼^[3]。巫爱珍等 1997 报道大肠杆菌表达的鲤鱼生长激素促进虾的生长^[5]。由于原核表达对蛋白质合成后折叠加工机制上的缺陷, 主要利用真核系统表达鲤鱼生长激素^[7-9]。

对虾白斑综合病毒 WSSV 是对虾养殖危害最大的病原体, 破坏性大, 爆发性强, 对全球对虾养殖影响广泛。对虾产业损失严重, 至今缺乏有效防治办法。WSSV 是一具有囊膜的双链 DNA 病毒^[10], WSSV 与对虾血淋巴细胞上的受体结合从而感染淋巴细胞^[11]。虽然, 在分子水平 WSSV 的感染机理尚未详尽阐明, 但随着 WSSV 全基因序列的公布, WSSV 的研究已经步入后基因组时代。VP28 蛋白曾在 *E. coli*、蓝藻和昆虫表达系统中表达^[12-14]。WSSV 结构和功能基因的分析、研究表明: VP28 是病毒 WSSV 粒子的表面囊膜蛋白^[14], 在病毒的吸附和入侵中起作用, 是病毒感染之关键因子^[12, 16, 17]。本

实验室李红霞、龙燕和其他人研究的实验结果也有力地支持这一点^[16, 20]。

本文采用毕赤酵母表达系统, 将 *gh* 和 *vp28* 基因融合克隆于穿梭质粒 pPIC6 C, 转化毕赤酵母后进行表达, 获得了融合蛋白 GH+VP28 的表达, 重组蛋白经注射螯虾, 研究促生长、抗病毒的功效。同时, 这对于不同蛋白融合表达, 并保持独立生物活性及实现蛋白功能的协同作用, 无疑是一种有价值的探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂和实验动物 健康克氏原螯虾购自武汉水产批发市场, 购买约 4g 重的幼虾和 10g 左右的成虾并在实验室饲养 15d。WSSV 来自实验室保存的发病斑节对虾及实验室人工感染 WSSV 的克氏原螯虾, -70℃ 保存。

TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶及限制性内切酶均为 TAKARA 公司产品, PCR 纯化回收试剂盒为上海华舜产品, DNA 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品。His-tag 亲和层析柱购于 Novagen 公司, Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天公司, 杀稻瘟素购

收稿日期: 2006-05-31; 修订日期: 2007-12-03

作者简介: 韩建山(1972—), 男, 汉族, 甘肃兰州人; 硕士研究生; 主要从事分子病毒学研究。E-mail: 620105abc@163.com

通讯作者: 孟小林(1956—), 主要从事基因工程药物及昆虫病毒分子生物学研究。Tel: 86-27-68754217; E-mail: Mengxiaolin8@hotmail.com

于 Invitrogen 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 菌株和质粒 PMD-18T 载体购自上海生工, 大肠杆菌 JM109、酵母穿梭质粒 pPIC6 α C、毕赤酵母 X-33 均购于 Invitrogen 公司。兔抗 VP28、质粒 PMD-18-*gh*、pUCm-*vp28* 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增鲤鱼生长激素 *gh* 和 WSSV *vp28*

根据 Genbank 发表的 *gh* 和 *vp28* 的序列, 分别设计两对引物, *gh* 的上游引物 primer1: GAATTC (*EcoR* iv) ATCAGACAACCAGCGGCTCTCAATAATGC. *gh* 的下游引物 primer2: TCTAGA (*Xba* iv) AACTCCAGGGTGCAGTTGGAATCCAG. *vp28* 上游引物 primer3: TCTAGA (*Xba* iv) ATGGATCTTTCTTCACTCTTTC, *vp28* 的下游引物 primer4: TCTAGA (*Xba* iv) AATTGCTCGTCTCAGTGCCAG. 分别以 PMD-18-*gh* 和 pUCm-*vp28* 为模板进行 PCR. PCR 的反应条件为: 95 °C 5min, 94 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 1min, 30 个循环后, 72 °C 10min. 胶回收 PCR 产物, 分别亚克隆进 PMD-18T 载体, 命名为 PMD-*gh* 和 PMD-*vp28*.

1.2.2 穿梭质粒 pPIC6 G (*gh* + *vp28*) 的构建 首先以 *EcoR* iv 和 *Xba* iv 双切 PMD-*gh* 和 pPIC6 α C, 目的片段胶回收后连接, 转化 JM109, 挑选阳性单克隆, 提取质粒, 命名为 pPIC6 G-*gh*. 然后用 *Xba* iv 单酶切 PMD18-*vp28*, 将回收的目的片段与 *Xba* iv 单酶切的 pPIC6 G-*gh* 连接, 转化 JM109, 酶切鉴定 *vp28* 正反向连接. 选取正向连接的单克隆, 提取质粒, 命名为 pPIC6 α G (*gh* + *vp28*), 并送上海生工有限公司测序。

1.3 pPIC6 α G (*gh* + *vp28*) 转化酵母细胞 用 *Bst*x I 单酶切 pPIC6 G (*gh* + *vp28*) 重组质粒, 胶回收线性化质粒, LiCl 法 (具体方法参照 Invitrogen 公司操作手册) 转化毕赤酵母 X-33 感受态细胞, 在 300mg/L 杀稻瘟素 YPD 平板上 30 °C 培养 72h, 挑选优势单克隆菌落, 提取酵母基因组进行 PCR 鉴定, 引物分别为通用引物 AOX1、primer1、2、primer3、4, PCR 反应条件为: 95 °C 5min, 94 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 2min30s, 30 个循环后, 72 °C 10min.

1.4 GH+ VP28 蛋白在毕赤酵母中的诱导表达、检测与纯化

1.4.1 GH+ VP28 蛋白的表达 挑选阳性单克隆菌落接种于 YPD 培养基, 30 °C 200r/min 培养过夜, 以 4% 的量转接入 BMGY 培养基, 继续培养至 OD₆₀₀ 为 4.0 左右, 把菌体移入同体积的 BMMY 培养基, 以终浓度 0.5% 甲醇进行诱导表达, 24h 诱导 1 次, 诱

导 48h 开始取样, 发酵 96h 停止. 离心 (4800r/min, 10min, 4 °C) 收集上清, 样品经 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 印迹反应分析鉴定目的蛋白。

1.4.2 GH+ VP28 蛋白的纯化 离心 (4800r/min, 10min, 4 °C) 发酵液, 回收上清, 装入透析袋 (截流量 10kD) 通过 PEG20000 4 °C 浓缩, 回收浓缩液, Ni²⁺ 柱纯化目的蛋白 (具体方法见 Ni²⁺ 柱-his BAND 纯化手册)。纯化样品经 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的纯化结果, 银染显色. 使用超滤管 (截流量为 10kD) 离心 (4750r/min, 10min, 4 °C) 收集纯化蛋白, 再用 PBS buffer 重悬, 并使用 Bradford 试剂盒测定纯化蛋白浓度。

1.5 重组蛋白 GH+ VP28 促虾体生长和抗 WSSV 感染作用的实验

1.5.1 重组蛋白 GH+ VP28 促虾体生长作用实验

将体重约 4g 的健康鳌虾随机分成 2 组, 每组 40 尾 (每组平均体重 (4 ± 0.2) g) 注射给样: 实验组 1、2 按照虾体重每克于腹节浅层肌肉处分别注射 10 μ L 0.4mg/mL 和 10 μ L 0.2mg/mL 重组蛋白 GH+ VP28, 阴性对照注射生理盐水. 每隔 1 周注射 1 次, 共注射 5 次. 在 22—25 °C 饲养, 每周每组称重并做记录. 每组重复 3 次实验. 体重增长率 (%) = [(W₁ - W₀) / W₀] × 100. W₁、W₀ 分别为注射后、注射前平均体重. 采用 *t* 检验法进行差异分析。

1.5.2 重组蛋白 GH+ VP28 抗 WSSV 感染作用实验

将体重约 10g 的健康鳌虾随机分成 3 组, 每组 20 尾. 注射给样: 按照虾体重每克注射 10 μ L 样品, 于倒数第 3 腹节浅层肌肉处注射, 分两次注射, 间隔 5d. 实验组: 注射 0.4mg/mL 重组蛋白 GH+ VP28. 第 2 次注射 2d 后, 将 WSSV 粗提液用 TN buffer 稀释 1 倍^[13], 注射感染鳌虾; 阳性对照组: 按照虾体重每克注射 TN buffer, 第 2 次注射 2d 后, 按同样的方法注射 WSSV 感染鳌虾; 阴性对照组: 按照虾体重每克注射 TN buffer, 第 2 次注射 2d 后, 再注射一次, 在 22—25 °C 继续饲养, 记录虾死亡的情况。

2 结果

2.1 PCR 扩增 *gh*、*vp28* 基因和穿梭质粒 pPIC6 G (*gh* + *vp28*) 的酶切鉴定

以 pPIC6 α G (*gh* + *vp28*) 穿梭质粒为模板, 分别对 *gh* 和 WSSV *vp28* 进行 PCR, PCR 产物大小位置符合 *gh*、*vp28* 大小. pPIC6 α G (*gh* + *vp28*) 穿梭质粒用 *EcoR* iv+ *Xba* iv 双酶切和 *Xba* iv 单酶切, 获得 *gh* 和 *vp28* 目标片段. pPIC6 α G (*gh* + *vp28*) 穿梭质粒为

4750bp, 位置大小符合。以 pPIC6αG-(*gh*+*vp28*) 穿梭质粒为模板, 以 primer1、4 为引物进行 PCR, PCR 产物为(*gh*+*vp28*) 全长融合基因, 大小为 1197bp; 以 pPIC6αG-(*gh*+*vp28*) 穿梭质粒为模板, 以通用引物 AOX1 进行 PCR, 获得约 1750bp 目标带, 位置大小符合(图1)。以上结果表明: 经 PCR 和酶切鉴定, *gh* 和 *vp28* 基因以前后顺序准确地插入到 pPIC6αC 穿梭质粒的克隆位点 *EcoR* iv 和 *Xba* iv 之间, 经上海生工测序, 基因序列完全一致, 符合翻译阅读框。

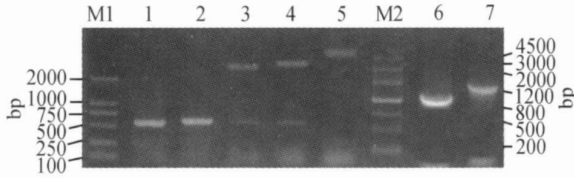


图1 重组穿梭质粒 pPIC6 G-(*gh*+*vp28*) 的酶切和 PCR 鉴定

Fig. 1 The identification of recombinant shuttle plasmids pPIC6G(*gh*+*vp28*)
M1, M2: marker; 1: PCR production of *vp28* by primer 3, 4; 2: PCR production of *gh* by primer 1, 2; 3: pPIC6 G-(*gh*+*vp28*)/*EcoR* iv + *Xba* iv; 4: pPIC6 G-(*gh*+*vp28*)/*Xba* iv; 5: recombinant vector pPIC6 G-(*gh*+*vp28*); 6: PCR production of *gh*+*vp28* by primer 1, 4; 7: PCR production of *gh*+*vp28* by primer AOX1

2.2 pPIC6αG-(*gh*+*vp28*) 转化酵母细胞的鉴定

提取酵母基因组作为模板, 分别以 AOX1, primer1、2, primer3、4, primer1、4 为引物进行 PCR, 大小分别为 1750bp、615bp、582bp、1197bp。5、6 泳道分别为 *gh* 和 *vp28* 阳性对照(图2)。以上结果表明: 线性化 pPIC6αG-(*gh*+*vp28*) 穿梭质粒准确地整合到酵母基因组的特定位点, 得到基因工程重组菌株。

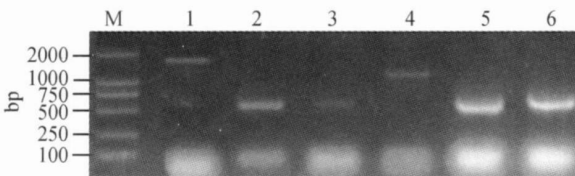


图2 酵母阳性菌基因组 PCR 鉴定

Fig. 2 The identification of positive strain genome by PCR
M: Marker DL2000; 1: PCR production of *gh*+*vp28* by primer AOX1; 2: PCR production of *vp28* by primer 3, 4; 3: PCR production of *gh* primer 1, 2; 4: PCR production of *gh*+*vp28* by primer 1, 4; 5, 6 control fragments of *gh* and *vp28* PCR

2.3 GH+ VP28 蛋白在毕赤酵母中的诱导表达、检测与纯化

2.3.1 GH+ VP28 蛋白在毕赤酵母中的诱导表达与检测

取离心后的 5mL 发酵液, 超滤浓缩 10 倍后, 取

40μL 样品跑 10% SDS-PAGE, 银染显色。并做 Western Blot 印迹反应鉴定目的蛋白, 在约 66kD 处出现目标带(图3)。

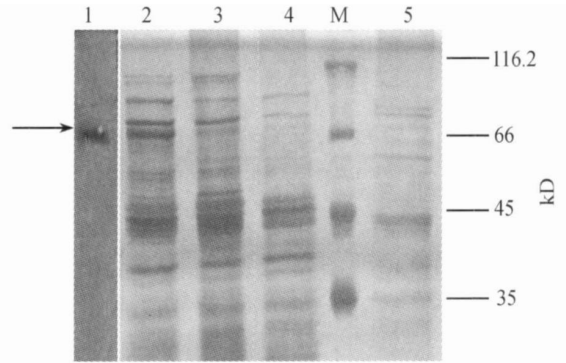


图3 SDS-PAGE 与 Western Blot 分析鉴定目的蛋白

Fig. 3 The analysis of fusional protein GH+ VP28 expression
1: Western Blot; 2: 96h induced by methanol; 3: 72h induced by methanol; 4: 48h induced by methanol; 5: control

2.3.2 (GH+ VP28) 蛋白的纯化

收集 10 管蛋白纯化液, 分别编号 1—10, 每管 1mL。从第 7、5、3、1 管各取样 30μL 跑 10% SDS-PAGE, 硝酸银染色。在 66kD 处出现单一的蛋白带, 从左到右依次为蛋白标准, 第 7、5、3、1 管(图4)。更换缓冲液后测定蛋白浓度为 1.20mg/mL。

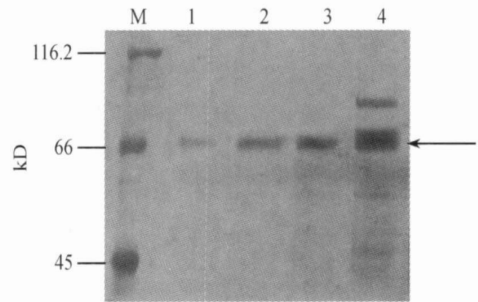


图4 目的蛋白 GH+ VP28 的纯化

Fig. 4 The SDS-PAGE analysis of purified fusional protein GH+ VP28

2.4 目的蛋白 GH+ VP28 的生物功能测活

2.4.1 重组蛋白 GH+ VP28 促虾体生长作用实验

各组实验虾在 5 周的注射期间成活率均为 100%, 实验的测量数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。经 5 周实验, 实验组 1 的体重增长率比对照组快 20%, 组 2 比对照组快 8%。经采用配对试验 *t* 检验法进行分析 ($\alpha = 0.05$, 自由度为 4), 与对照组相比, 组 1 体重有显著差异, 组 2 差异不显著。结果表明: 融合蛋白 GH+ VP28 对虾体生长有促进作用。以下实验数据均为三组重复实验所得(表 1)。

表 1 各组实验虾经 5 周后平均体重统计

Tab. 1 The average weights of three group shrimp injected GH+ VP28 for 5 weeks

Time/ Week	Group 1(x ± s) g	Group 2(x ± s) g	Control(x ± s) g
0	4.04 ± 0.21	4.05 ± 0.20	4.01 ± 0.17
3	8.20 ± 0.15	7.60 ± 0.18	7.90 ± 0.17
5	9.80 ± 0.14	8.71 ± 0.19	8.52 ± 0.16

2.4.2 重组蛋白 GH+ VP28 抗 WSSV 感染作用实验

在 22℃ 的条件下养殖的结果显示, 注射纯化融合蛋白 GH+ VP28 蛋白组的鳌虾 9d 后累积死亡率为 35%, 阳性对照组的鳌虾在感染 WSSV 9d 后累积

死亡率达到了 100%, 并在 3—5d 达到死亡高峰, 而注射了 TN buffer 的阴性对照组鳌虾无任何病理现象。这说明注射重组融合蛋白 GH+ VP28 可以明显提高对虾抗 WSSV 感染力。以上实验数据均为三组重复实验所得(图 5)。

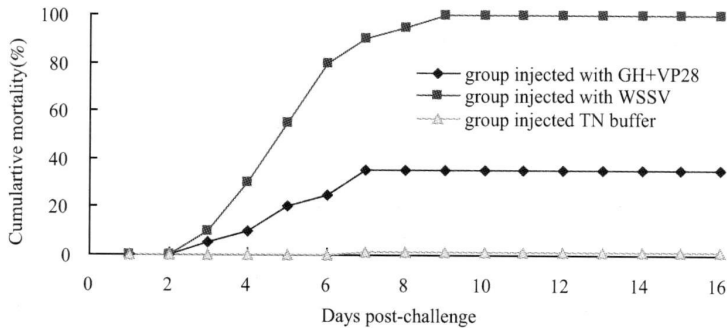


图 5 感染 WSSV 后各组虾体生长累计死亡率曲线

Fig. 5 Time-mortality relationship of each group of crayfish after infected WSSV

1: group injected with WSSV: injected with TN buffer twice at 5 days interval and then infected WSSV 2 days later; 2: group injected with GH+ VP28 injected with purified GH+ VP28 twice at 5 days interval and then infected WSSV 2 days later; 3: group injected with TN buffer: injected with TN buffer twice at 5 days interval and infected with TN buffer 2 days later

3 讨论

1985 年, Sekine 首先在大肠杆菌中表达了鱼类生长激素以后, 运用基因工程技术, 先后在酵母和家蚕中表达了具有活性的 GH 蛋白。GH 不仅能促进鱼类生长, 也能促进贝类、虾类的生长, 具有广谱的水生生物的促生长作用。研究表明: 鱼生长激素 GH 能提高虾类 10%—20% 的生长率。对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP28 是病毒感染的关键蛋白因子。WSSV 囊膜蛋白 VP28 具有抗 WSSV 感染对虾的作用, 研究表明 VP28 蛋白保护虾体抗 WSSV 感染的累计死亡率达小于 30%^[13, 15, 17]。本实验结果显示重组融合蛋白 GH+ VP28 能提高虾体 20% 的生长率, 有效地保护虾体抗 WSSV 感染有效性。由于融合表达, VP28 的功能活性受到影响, 因此蛋白保护虾体抗 WSSV 感染的累计死亡率接近 35%。

毕赤酵母自 20 世纪 80 年代被开发为一种高效外源表达系统, 与大肠杆菌和酿酒酵母相比具有许

多优点。采用毕赤酵母 X-33 为表达宿主, 以分泌型穿梭质粒 pPIC6 C 为表达载体, 高效表达的 GH+ VP28 蛋白在 N 末端信号肽的引导下直接分泌到发酵液中, 二硫键正确折叠成为有活性的重组蛋白。

本实验将鲤鱼生长激素基因 GH 和对虾白斑病毒 WSSV VP28 在毕赤酵母 X-33 进行融合分泌表达, 同时, 研究了重组融合蛋白 GH+ VP28 在鳌虾中的促生长作用和抗病毒感染作用。采取注射给药, 重组蛋白 GH+ VP28 直接进入虾体内, 作用的效果要比口服更迅速地反映出来。尽管促生长实验和抗病毒实验是在不同生长期的鳌虾中进行的, 但是实验结果明确地反映出重组蛋白 GH+ VP28 既实现了对鳌虾的促生长作用, 又实现了抗 WSSV 感染的保护效果, 这对日后在虾的促生长抗病毒方面具有潜在的应用价值。

本实验生物测活虽然以中华鳌虾为动物模型, 获得预想的结果, 但实验室远离沿海对虾养殖区, 该蛋白能否对对虾产生促生长和抗病毒的双重功效,

还需要进一步对对虾做实验研究。

参考文献:

- [1] Lin H R. Fish physiology [M]. Guangzhou: Guangdong High Education Press, 1999, 210—212 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 1999, 210—212]
- [2] Sekine S, Mizukami T, Nishi T, *et al.* Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 4306—4310
- [3] Zhu Z L, He G L, *et al.* Novel gene transfer into fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L.) [J]. *Z Angew Idthylo*, 1985, **10**: 31—34
- [4] Wu A Z, Sun Y K. Study on the production of recombinant common carp fish somatotrapin [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, **13**(2): 200—205 [巫爱珍, 孙玉昆. 基因工程鱼生长激素的生产研究. 生物工程学报, 1997, **13**(2): 200—205]
- [5] Xu B, Miao H Z, Mai K S, *et al.* Studies of the effects of recombinant fish growth hormone on survival and growth enhancement of Chinese Prawn *Penaeus chinensis* [J]. *Marine Sciences/Monthly*, 2000, **24**(11): 54—56 [徐斌, 苗宏志, 麦康森, 等. 重组鱼类生长激素对中国对虾成活率及促生长作用的研究. 海洋科学, 2000, **24**(11): 54—56]
- [6] Pan D, Shuang B, *et al.* Research on application of fish growth hormone in aquaculture [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2001, **20**(4): 85—90 [潘登, 双宝, 等. 鱼生长激素在水产养殖中的应用. 台湾海峡, 2001, **20**(4): 85—90]
- [7] Li Y H, Bai J J, Li X H, *et al.* Expression of common carp growth hormone in yeast *P. pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, **17**(4): 488—491 [李英华, 白俊杰, 李新辉, 等. 鲤鱼生长激素在毕赤酵母中的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, **17**(4): 488—491]
- [8] Wang W, Sun Y H, Wang Y P. Expression of grass carp growth hormone in the yeast *pichia pastoris* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(4): 301—306 [王伟, 孙永华, 汪亚平. 草鱼生长激素在毕赤酵母中的分泌表达. 遗传学报, 2003, **30**(4): 301—306]
- [9] Ho W K K, *et al.* Expression of grass carp growth hormone by baculovirus in silkworm larvae [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1381**(3): 331—339
- [10] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Vlask J M, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, **286**: 7—22
- [11] Song X L, Liang Y, Huang J, *et al.* *In vitro* binding between white spot syndrome virus and hemocytes of penaeid shrimp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(4): 386—393 [宋晓玲, 梁艳, 黄健, 等. 白斑综合症病毒与对虾血淋巴细胞外结合实验. 水生生物学报, 2006, **30**(4): 386—393]
- [12] Li H X, Meng X L, Xu J P, *et al.* Protein of crayfish, *cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein [J]. *Fish Dis*, 2005, **28**: 285—291
- [13] Long Y, Xu J P, Wang J, *et al.* Expression of envelope protein VP28 of *Penaeus monodon* WSSV in *E. coli* and the effect against WSSV [J]. *Virologica Sinica*, 2006, **21**(2): 178—180 [龙燕, 徐进平, 王健, 等. 对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP28 的表达及其抗病毒感染作用. 2006, **21**(2): 178—180]
- [14] Xu Z R, Du H H, Xu Y X, *et al.* Crayfish *Procambarus clarkii* protected against white spot syndrome virus by oral administration of viral proteins expressed in silkworms [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**(17): 179—183
- [15] Van Hulten M C W, Goldbach, R W, Vlask J M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. *J Gen Virol*, 2000, **81**: 2525—2529
- [16] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Vlask J M, *et al.* White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp [J]. *Virology*, 2001, **285**: 228—233
- [17] Syed Musthaq S, Yoganandhan K, Sudhakaran R, *et al.* Neutralization of white spot syndrome virus of shrimp by antiserum raised against recombinant VP28 [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**(17): 98—104
- [18] Witteveldt J, Vlask J M, Van Hulten M C W, *et al.* Protein of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, **16**: 571—579
- [19] Guan Y, Yu Z, Li C. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus* [J]. *J Invert Pathol*, 2003, **83**: 257—260
- [20] Yoganandhan K, Syed Musthaq S, *et al.* Temporal analysis of VP28 gene of Indian white spot syndrome virus isolate (WSSV) in different crustacean hosts [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**(17): 71—84

FUSION-EXPRESSION AND BIOACTIVITY ANALYSIS OF CARP GROWTH HORMONE GENE AND ENVELOPE PROTEIN VP28 OF *PENAEUS MONODON* WSSV

HAN Jian-Shan, LONG Yan, MENG Xiao-Lin, XU Jin-Ping, LU Wei and WANG Jian

(State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: Carp growth hormone is a secreted protein from growth gland for promoting carp growth. White spot syndrome virus (WSSV) VP28 is one of the envelope proteins acting as a key factor to infect the shrimp. Two pairs of primers are designed and synthesized respectively according to the sequence of gene *gh* and *vp28*. The *gh* and *vp28* DNA fragments were amplified by PCR respectively. Gene *gh* and *vp28* were fused and cloned into yeast shuttle vector pPIC6αC at the site of polyclone resulting to recombinant vector pPIC6αC-(*gh*+*vp28*), gene *gh* lying in 5' end and gene *vp28* in 3' end. Shuttle vector pPIC6αC-(*gh*+*vp28*) were linearized with *Bst*XI and transformed into *P. pastoris* X-33 strain. Incubated transformant on YPD plate with 300mg/mL blasticidin at 30 °C for 72h. Selected positive clone and extracted yeast genome for identifying with PCR by general primer AOX1, primer 1, 2, 3 and 4, respectively. Results showed that interest gene was introduced into target site of *P. pastoris* X-33 genome by homologous recombination. After incubated in YPD medium at 30 °C for 24h, 4% yeast volume were transferred into BMGY medium to incubate. When OD₆₀₀ reached 4, engineered yeast were induced by methanol at ultimate concentration 0.5% with one time every 24h for continuous 4 days. Fusion protein (GH+VP28) is expressed and secreted out from host yeast. Supernatant were collected after centrifugation at 4800 r/min for 10min at 4 °C. The molecular weight of the fusion engineered protein was about 66kDa, which was identified by SDS-PAGE and Western Blot analysis. The fusion engineered protein (GH+VP28) with 6×his tag at the C end was purified by Ni²⁺-column chromatography and determined concentration with Bradford kit. Protein (GH+VP28) was injected into two groups of crayfish to test activity of stimulating growth and protecting against wssv independently. Test data of stimulating growth were collected and analyzed with testing significance of difference of T inspection after 5 weeks, and test data of protection against wssv were instructed by accumulative mortality curve after 19 days. Both of the test data indicated that the protein (GH+VP28) either stimulated crayfish growth by 20% percent faster than control and difference in statistics between test and control group was significant or protected crayfish against wssv to increase livability by 65% percent. Results showed that the fusion engineered protein (GH+VP28) had the effects of crayfish stimulation growth and protection against wssv. As stimulation-growth agent, we employed method of injecting to test its effect rather than oral in order to take effect as hormone. Though effect as stimulation-growth agent was not distinct, result still was exciting, and we took a valuable step for exploring carp GH to apply on crayfish breed industry. As gene-engineering bioactivity polypeptide, protein (GH+VP28) protected crayfish against WSSV acting as subunit vaccine. Protein (GH+VP28) supplied lower protection with 35% mortality than engineered protein *vp28* and *vp28-vp29* with 30%^[12]. We analyzed that natural structure of protein (GH+VP28) was influenced in some degree due to fusion, thereby, its function or bioactivity decreased correspondingly, nonetheless, test elicited us new thoughts to going further for exploring function of fusion engineered protein (GH+VP28).

Key words: Carp growth hormone GH; Wssv; VP28; *gh*+*vp28*; *P. pastoris*; Activity analysis