

三疣梭子蟹 *LGBP* 基因的重组表达及微生物结合实验

陈寅儿, 金珊*, 张樱, 赵青松, 王国良, 王春琳

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 教育部应用海洋生物重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 将扩增得到的三疣梭子蟹 *LGBP* 基因开放阅读框与表达载体 pET-22b(+) 连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)plysE 后 IPTG 诱导表达。经 SDS-PAGE 检测, 发现诱导组比空载体和未诱导组多出一条分子量约为 41 ku 的表达产物, 与预测的重组蛋白分子量大小基本一致。重组质粒在不同 IPTG 浓度和不同温度条件下诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析结果显示, 低浓度 0.4 mmol/L IPTG 和 30 °C 诱导能有效减少菌体蛋白的本底表达。用纯化的重组蛋白连续免疫小鼠, 4 周后得到抗血清, 经 Western-blotting 检测, 其具有很好的特异性。微生物结合实验表明, 重组表达的 pET-LGBP 具有较强的生物活性, 其与丹麦啤酒酵母、巨大芽孢杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、大肠杆菌等均有结合能力。

关键词: 三疣梭子蟹; 脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白; 重组表达; 抗血清

中图分类号: Q 78; S 917

文献标识码: A

无脊椎动物由于没有获得性免疫, 因此其先天免疫的“非己”识别更为重要, 该阶段对于其免疫应答的发生与否具有决定性的作用^[1]。这种“非己”识别是因为存在某些特异性的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 它能够识别并结合微生物表面保守的, 而在宿主中又不存在的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[2]。

脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白(lipopolysaccharide- β -1,3-glucan binding protein, LGBP)作为一种模式识别受体在甲壳动物的免疫系统中占有重要地位, 因其能够识别革兰氏阴性菌和真菌的细胞壁多糖成分脂多糖和 β -1,3-葡聚糖而得名。据报道, 目前已从淡水螯虾(*Pacifastacus leniusculus*)^[3]、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[4]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[5]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[6]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[7]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[8]等水产动物中克隆得到 LGBP, 并对其结构、性质进行了深入研究, 但有关其功能的研究很少。本研

究在得到三疣梭子蟹 *LGBP* 基因全长序列的基础上(GenBank 注册号为 GU328036), 重新设计了一对用于基因表达的引物, PCR 扩增开放阅读框, 构建 pET-LGBP 重组表达载体, 并转入大肠杆菌中表达。表达的目的蛋白经纯化后免疫小鼠, 制备出抗血清, 并检测了其与微生物的结合能力, 为今后三疣梭子蟹 *LGBP* 的分离纯化及其功能的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用三疣梭子蟹购自宁波庄市梭子蟹暂养场, 蟹体健康、附肢完整, 于实验室暂养备用。5 周龄 ICR 小鼠, 雌性, 购于宁波大学医学院实验动物中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*) TGI、BL21(DE3)plysE 菌株和原核表达载体 pET-22b(+) 为本实验室所保存。RNA 提取试剂 Unizol 购于上海博星; 胶回收试剂盒、柱式质粒小量抽提试剂盒、Western-blotting Kit 为上海生工产品; PrimeScriptTM1st Strand cDNA Synthseis Kit、pMD₁₉T、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I、DNA Ligation Kit

收稿日期:2010-11-25 修回日期:2011-01-09

资助项目:国家创新研究群体科学基金(IRT0734);宁波市科技局基金(2008A610073,2008C11001)

通讯作者:金珊, E-mail:jinshan@nbu.edu.cn

Ver. 2.0、蛋白质分子量标准(低)等均购自 TaKaRa 公司;预染低分子量蛋白质 Marker 为北京索莱宝公司产品,其余常规药品试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 三疣梭子蟹 *LGBP* 基因开放阅读框的克隆

按照 Unizol 试剂说明书提取三疣梭子蟹肝胰腺总 RNA, SMART cDNA 的合成参照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行。根据本实验室发表的三疣梭子蟹 *LGBP* 基因全长 cDNA 序列(GenBank 注册号为 GU328036),设计开放阅读框(open reading frame, ORF)引物对 LgExF (CCATATGCAGGCCGCCCTATGTGCAT) 和 LgExR (CCTCGAGTTATTCCTCGGAGC-TAGTCATC),下划线为添加的限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I 识别序列。以肝胰腺 SMART cDNA 为模板,用 *LA Taq* 进行 RT-PCR 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收,与 pMD10-T 连接并转化 *E. coil* TG1,涂于含 Amp(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 琼脂平板上,37 °C 过夜培养,挑取单菌落,筛选阳性克隆产物后送上海英骏公司测序。

1.3 重组载体的构建

用 *Nde* I 和 *Sal* I 分别双酶切测序正确的 *LGBP* 基因 ORF 和 pET-22b(+)载体,电泳检测酶切结果并切胶回收。回收到的基因与载体用 DNA Ligation Kit Ver. 2.0 连接后转化 *E. coil* TG1,PCR 筛选阳性克隆并酶切验证。对验证正确的质粒送上海英骏公司测序。

1.4 重组蛋白的诱导表达

分别取 1 μL 测序正确的重组质粒 pET-*LGBP* 和 1 μL pET-22b(+)转化 *E. coil* BL21 (DE3)plysE 后,挑取阳性单菌落接种于含 Amp(终浓度为 100 μg/mL)的 5 mL LB 培养基中,37 °C 振荡培养过夜。次日按 1:50 扩大培养,37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 进行诱导。每隔 1 小时取 1 mL 菌液于 4 °C,12 000 r/min 离心 5 min 后去上清,沉淀用 100 μL 去离子水重悬,并加入等体积 2 × SDS PAGE Loading Buffer,充分振荡后 100 °C 煮沸 5 min,立即冰浴,SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况。

取诱导培养 3 h 的菌液 10 mL,冰浴超声波破碎(超声 3 s,停 5 s,共 30 次)后 12 000 r/min

离心 5 min,分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 检测。

1.5 不同诱导条件下重组蛋白的表达

将重组质粒 pET-*LGBP* 在 37 °C 下培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时等分 4 份,加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 和 1.0 mmol/L,再分别于 30 °C 和 37 °C 条件下进行诱导,3 h 后 SDS-PAGE 分析其在不同诱导浓度及不同温度条件下的表达量。

1.6 非融合蛋白的纯化

于 37 °C 200 mL 含 Amp(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 培养基中大量培养阳性重组菌,至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时加 IPTG(终浓度 0.4 mmol/L)转至 30 °C 诱导 3 h 后全部用于 SDS-PAGE。电泳结束后,取下凝胶用 0.25 mol/L KCl 溶液浸泡 5 min,用干净的刀片切下目的条带,加入适量的 PBS 研磨,4 °C 静置一段时间后离心取上清,取 10 μL 进行 SDS-PAGE 以检查蛋白的纯化效果,其余 -20 °C 冻存^[9]。

1.7 抗血清的制备及效价测定

免疫前先采集小鼠阴性血清。随后将 pET-*LGBP* 抗原、PBS 分别与等体积福氏完全佐剂充分混合,形成油包水乳剂后注射于小鼠腹腔。随后每隔 7 天免疫一次,pET-*LGBP* 抗原和 PBS 均不加佐剂,剂量为首次的 1/2,共免疫 4 次。末次免疫 3 d 后摘除小鼠眼球取血,于 37 °C 温育 1 h 后 4 °C 过夜,离心分离血清,-20 °C 冻存。抗体效价测定用免疫双扩散法,达到 1:16 以上者为合格。

1.8 Western-blotting

将纯化后含目的条带的 pET-*LGBP* 蛋白、空载体以及预染蛋白 Marker 进行 SDS-PAGE,然后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜(1:500 稀释),用 PBST 和 TBS 洗涤后二抗室温孵育 1 h(HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1:5 000 稀释),TBST 洗涤后用 DAB 显色。

1.9 微生物结合实验

依据杜欣军^[10]报道的方法进行微生物结合实验。共选取了 1 种酵母菌(丹麦啤酒酵母,*Saccharomyces cerevisiae*)、4 种革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌,*Bacillus subtilis*;巨大芽孢杆菌,*B. megaterium*;蜡状芽孢杆菌,*B. cereus*;金黄色葡萄球菌,*S. aureus*)和 3 种革兰氏阴性菌(副溶血弧菌,*Vibrio parahaemolyticus*;溶藻弧菌,

V. alginolyticus; 大肠杆菌, *E. coli*)。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 *LGBP* 基因 ORF 分析

经 RT-PCR 扩增, 在 1.0 kb 处得到一条特异性条带(图 1), 经测序及 BLAST 分析表明与预期的 1 095 bp 完全相符, 编码一个由 365 个氨基酸组成的分子量为 41 352.16 u 的蛋白, N-端前 16 个氨基酸为信号肽序列。氨基酸序列分析表明 (<http://ca.expasy.org/tools/>), 三疣梭子蟹 *LGBP* 含有两个可抑制结节形成的细胞粘附肽 RGD(Arg-Gly-Asp) 基元; 两个潜在的 N-糖基化位点 NRS 和 NDS; 一个激酶 C 的磷酸化位点 SAR; 从蛋白 78 位至 280 位氨基酸为 Glyco_hydro_16 结构域。二级结构预测表明(DNAStar 软件), 三疣梭子蟹的脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白结构中既有 α 螺旋, 也有 β 折叠, 此外还有一定数量的 β 转角以及无规卷曲, 因此在分类结构上属于 $\alpha + \beta$ 的混合型蛋白。

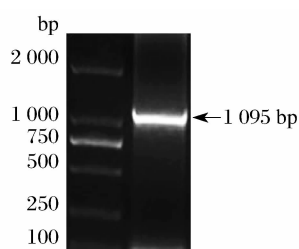


图 1 三疣梭子蟹 *LGBP* 基因 ORF 序列

M. DNA 分子量标准 DL2000; 1. ORF 序列扩增结果。

Fig. 1 ORF sequence of *LGBP* from *P. trituberculatus*

M. DNA marker DL2000; 1. amplification of ORF sequence.

2.2 重组载体的鉴定

用 *Nde* I 和 *Sal* I 同时对 pMD₁₀-T-*LGBP* 和 pET-22b(+) 空载体进行双酶切(图 2-A), 回收产物经连接转化后从平板上挑取单克隆, 用菌液 PCR 完成初步筛选。对阳性克隆进行培养, 提取重组质粒 pET-*LGBP*, 再用 *Nde* I 和 *Sal* I 进行双酶切验证, 切下约 1 100 bp 的目的条带和 5 000 bp 左右的载体条带, 经测序后进一步证实重组载体构建成功(图 2-B)。

2.3 重组表达

将测序验证正确的重组质粒转入 *E. coil* BL21(DE3)plysE 中, 经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 检测, 发现诱导组比空载体和未诱导组多出一条

分子量约为 41 ku 的表达产物(图 3), 与预测的重组蛋白分子量大小基本一致。菌液经超声波破碎后, 目的蛋白主要以可溶性蛋白形式存在于上清中(图 3)。

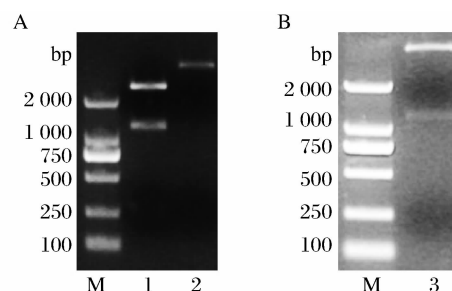


图 2 重组质粒酶切验证

M. DNA 分子量标准 DL2000; 1. 用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD₁₀-T-*LGBP*; 2. 用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pET-22b(+) 空载体; 3. 用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒 pET-*LGBP*。

Fig. 2 The identification of the recombination plasmid

M. DNA marker DL2000; 1. pMD₁₀-T-*LGBP* verified by double-enzyme cleavage; 2. Normal pET-22b(+) vector verified by double-enzyme cleavage; 3. The recombination plasmid pET-*LGBP* verified by double-enzyme cleavage.

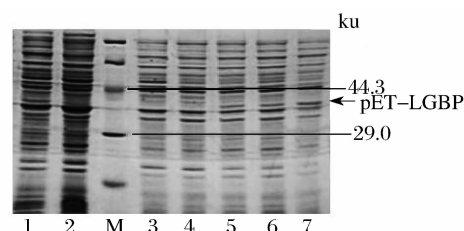


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准(低); 1. 超声波破碎离心后的上清; 2. 超声波破碎离心后的沉淀; 3. pET-22b(+) 空载体; 4. pET-*LGBP* 诱导前; 5. pET-*LGBP* 诱导 1 h; 6. pET-*LGBP* 诱导 2 h; 7. pET-*LGBP* 诱导 3 h。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

M. Protein molecular weight Marker (low); 1. supernatant after centrifugation step; 2. precipitation after centrifugation step; 3. Normal pET-22b(+) vector; 4. pET-*LGBP* without induction; 5. pET-*LGBP* induced with IPTG for 1 hour; 6. pET-*LGBP* induced with IPTG for 2 hours; 7. pET-*LGBP* induced with IPTG for 3 hours.

重组质粒在不同 IPTG 浓度和不同温度条件下诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析结果显示, 重组蛋白的表达量变化不大, 但低浓度 IPTG 和低温诱导能有效减少菌体蛋白的本底表达(图 4)。

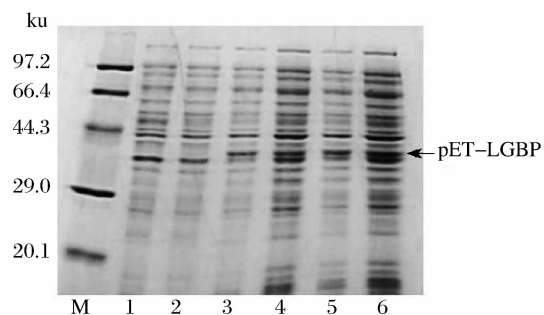


图4 重组蛋白在不同条件诱导下的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白质分子量标准(低); 1. pET-22b(+)空载体; 2. pET-LGBP 诱导前; 3. 30 °C 0.4 mmol/L IPTG 诱导 3 h; 4. 30 °C 1.0 mmol/L IPTG 诱导 3 h; 5. 37 °C 0.4 mmol/L IPTG 诱导 3 h; 6. 37 °C 1.0 mmol/L IPTG 诱导 3 h。

Fig. 4 Expression of recombinant protein induced in different conditions analyzed by SDS-PAGE

M. Protein molecular weight Marker (low); 1. Normal pET-22b(+) vector; 2. pET-LGBP without induction; 3. pET-LGBP induced with 0.4 mmol/L IPTG for 3 hours at 30 °C; 4. pET-LGBP induced with 1.0 mmol/L IPTG for 3 hours at 30 °C; 5. pET-LGBP induced with 0.4 mmol/L IPTG for 3 hours at 37 °C; 6. pET-LGBP induced with 1.0 mmol/L IPTG for 3 hours at 37 °C.

2.4 非融合蛋白的纯化

将大量诱导 3 h 后的目的蛋白进行切胶纯化,再经 SDS-PAGE 检测,发现在 44.3 和 29.0 ku 之间只有目的蛋白条带,而无杂带(图 5)。

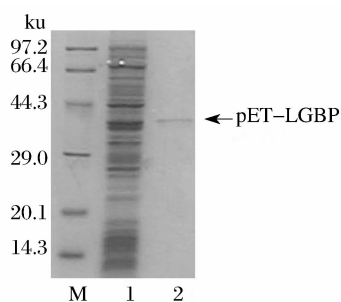


图5 重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白质分子量标准(低); 1. pET-LGBP 诱导 3 h; 2. 纯化后的 pET-LGBP。

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein

M. Protein molecular weight Marker (low); 1. pET-LGBP induced with IPTG for 3 hours; 2. The purified recombinant protein pET-LGBP.

2.5 血清效价及 Western-blotting 结果

用纯化的重组蛋白连续免疫小鼠,在免疫 5 次后抗血清效价达到 16,随后摘除小鼠眼球取

血。以 pET-22b(+)空载体作为对照,用纯化后的重组蛋白与鼠抗血清进行 Western-blotting 检测,免疫印迹结果显示:免疫前血清与 PBS 对照组分别呈阴性反应;纯化后的重组蛋白 pET-LGBP 与鼠抗血清发生了明显的特异性免疫反应,在 41 ku 处有一条大小相应的明显的蛋白带(图 6),而 pET-22b(+)空载体对照则无反应,说明该重组蛋白有很好的免疫原性。

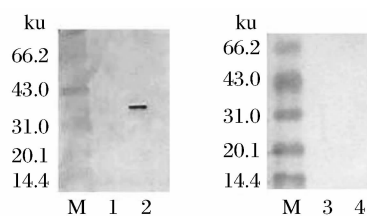


图6 鼠抗血清的 Western-blotting 分析

M. 预染低分子量蛋白质 Marker; 1. pET-22b(+)空载体; 2. 纯化后的 pET-LGBP; 3. 免疫前血清; 4. PBS 对照。

Fig. 6 Western-blotting analysis of mouse antiserum

M. Prestained protein molecular weight Marker (low); 1. Normal pET-22b(+) vector; 2. The purified recombinant protein pET-LGBP; 3. preimmune serum; 4. PBS control.

2.6 微生物结合实验

为了验证脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白对微生物的结合能力,分别将重组表达的 pET-LGBP 与培养至对数生长期的微生物进行孵育,经多次洗涤和洗脱后用 Western-blotting 检测结合效果。结果显示,三疣梭子蟹的脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白对丹麦啤酒酵母、巨大芽孢杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌以及大肠杆菌均有结合能力(图 7)。

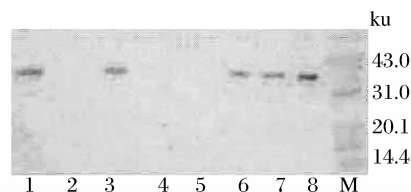


图7 Western-blotting 检测重组表达的 pET-LGBP 对微生物的结合能力

M. 预染低分子量蛋白质 Marker; 1. 丹麦啤酒酵母; 2. 枯草芽孢杆菌; 3. 巨大芽孢杆菌; 4. 蜡状芽孢杆菌; 5. 金黄色葡萄球菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 大肠杆菌。

Fig. 7 Western-blotting analysis of pET-LGBP binding activity to microorganism

M. Prestained protein molecular weight Marker (low); 1. *S. cerevisiae*; 2. *B. subtilis*; 3. *B. megaterium*; 4. *B. cereus*; 5. *S. aureus*; 6. *V. parahaemolyticus*; 7. *V. alginolyticus*; 8. *E. coli*.

3 讨论

据资料显示,目前已从多种甲壳动物中克隆得到了脂多糖- β -1,3-葡聚糖结合蛋白(LGBP),并对其性质进行了深入研究,但有关LGBP功能的研究仅ROUX等^[11]报道南美兰对虾(*Penaeus stylirostris*)LGBP在抵御病毒入侵时起到了积极的作用;SEKI等^[12]认为螯的LGBP与脂多糖或葡聚糖特异结合后能激活血淋巴的凝集反应;LEE等^[3]和BILEJ等^[13]分别研究表明淡水螯虾(*P. leniusculus*)、蚯蚓(*Eisenia foetida*)的LGBP还参与了酚氧化酶激活系统,而至今未见蟹类LGBP功能的相关研究。为了明确三疣梭子蟹LGBP的具体作用,本研究首先对三疣梭子蟹的LGBP进行了重组表达。在筛选表达系统时,选择了遗传背景清楚,容易培养以及有大量可供选择的克隆与表达载体的大肠杆菌表达系统^[14],该系统在克隆表达重组蛋白时表达量可达菌体蛋白的50%^[15]。试验结果表明,重组菌在37℃条件下,以终浓度0.4 mmol/L的IPTG诱导1 h后就有重组蛋白的表达,随着诱导时间的延长,蛋白表达量略有增加。考虑到重组蛋白的进一步分离与纯化,作者比较研究了在30℃和37℃条件下,低浓度0.4 mmol/L和高浓度1.0 mmol/L IPTG的诱导表达,结果发现在不同温度和不同IPTG浓度下,重组蛋白的表达量变化不大,但0.4 mmol/L IPTG及30℃诱导能有效减少菌体蛋白的表达,便于从SDS-PAGE胶中直接回收非融合蛋白^[16]。采用该法回收到的蛋白纯度虽然有所下降,但由于其方便、快速仍被广泛应用,而且该法纯化的蛋白仍具有线性表位,因此免疫动物后可获得较好的免疫效果^[17]。

多克隆抗体相对于单克隆抗体制备简单、快速、投资小而被广泛应用,获得的高效价抗血清可用于疾病的诊断、治疗等研究工作。本研究选用了ICR小鼠作为免疫动物,价格不贵且易饲养和采血,适合低剂量抗原、短程免疫法。每只小鼠首次注射抗原量为50~100 μ g,并与等体积完全福氏佐剂混合,有助于增加抗原的刺激作用,延长抗原在体内的存留时间,还可提高抗体的效价。随后加强免疫剂量为首次免疫剂量的1/2,不加佐剂,每隔7天免疫一次,连续免疫4周后抗体效价经检测达到合格,且小鼠无一死亡,抗血清经

Western-blotting检测具有很好的特异性。微生物结合实验进一步表明,获得的鼠抗血清具有较强生物活性,对丹麦啤酒酵母、巨大芽孢杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌以及大肠杆菌均有结合能力,这均为今后深入研究该蛋白的具体功能打下了基础。

参考文献:

- [1] 姚翠鸾,王志勇,相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. 动物学研究,2006,27(5): 549-557.
- [2] MEDZHITOV R, JANEWAY C A Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response [J]. Curr Opin Immunol,1997,9:4-9.
- [3] LEE S Y, WANG R, SODERHALL K. A lipopolysaccharide-and β -1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. J Biol Chem,2000,275(2):1337-1343.
- [4] 柳峰松. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗菌因子及模式识别蛋白的研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2005.
- [5] YEH M S, CHANG C C, CHENG W. Molecular cloning and characterization of lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its transcription in relation to foreign material injection and the molt stage [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2009,27:701-706.
- [6] CHENG W, LIU C H, TSAIA C H, et al. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide-and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005,18(4):297-310.
- [7] SU J G, SONG L S, XU W, et al. cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide-and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri* [J]. Aquaculture, 2004, 239: 69-80.
- [8] ZHAO D X, CHEN L Q, QIN C J, et al. Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Comp Biochem Phys B,2009,154(1):17-24.
- [9] 张祖兴,李明云,陈炯,等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)热激蛋白的基因克隆、原核表达及抗血清

- 的制备[J]. 海洋与湖沼,2006,37(4):337-341.
- [10] 杜欣军. 中国明对虾先天免疫的模式识别与效应分子[D]. 济南:山东大学,2007.
- [11] ROUX M M, PAIN A, KLIMPEL K R, *et al.* The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. *J Virol*, 2002, 76(17):7140-7149.
- [12] SEKI N, MUTA T, ODA T, *et al.* Horseshoe crab (1,3)-h-D-glucansensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to h-glucan-binding proteins[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(2):1370-1374.
- [13] BILEJ M, DE BAETSELIER P, VAN DIJCK E, *et al.* Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defense molecule recognize Gram-negative and Gram-positive bacteria [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(49):45840-45847.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南下册 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1215-1265.
- [15] STUDIER F W, ROSENBERG A H, DUNN J J, *et al.* Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185: 60-89.
- [16] MASON P W, ZUGEL M U, SEMPRONI A R, *et al.* The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli* [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(9):2170-2114.
- [17] 赵慧, 邓永强, 刘忠钰, 等. 登革 2 型病毒非结构蛋白 NS4B 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备 [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(1):4-7.

The study of recombinant expression, preparation of antiserum and binding activity to microorganism of *LGBP* gene from *Portunus trituberculatus*

CHEN Yin-er, JIN Shan*, ZHANG Ying, ZHAO Qing-song, WANG Guo-liang, WANG Chun-lin

(Faculty of Life Science and Biotechnology of Ningbo University, Key Laboratory of Applied Marine Biology by the Ministry of Education, Ningbo 315211, China)

Abstract: The lipopolysaccharide-and beta-1,3-glucan-binding protein (LGBP) is a pattern recognition receptor which is fundamental for the innate immune response of crustaceans. A pair of primers were designed according to *LGBP* cDNA and were used for ORF amplification. Then the fragment was subcloned into pET-22b(+) and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3)plySE. We got a 41 ku clear visible band in the expected position by SDS-PAGE detection, which indicated that it was the same as the expected molecular weight, and the negative controls were blank. Expression of recombinant protein induced under different conditions indicated that lower concentration of IPTG (0.4 mmol/L) and lower temperature 30 °C could reduce the expression of background effectively by SDS-PAGE detection. The purified recombinant protein was used as antigen to prepare antiserum in mouse directly. Four weeks later, a polyclonal antiserum was obtained and it was specified by Western-blotting analysis. At last, three types of Gram-negative bacteria (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *E. coli*), four types of Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *S. aureus*) and one fungus (*Saccharomyces cerevisiae*) were utilized to analyze pET-LGBP binding activity. Our data suggested that pET-LGBP was able to bind *S. cerevisiae*, *B. megaterium*, *V. Parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *E. coli*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; LGBP; recombination expression; antiserum

Corresponding author: JIN Shan. E-mail: jinshan@nbu.edu.cn