

Doi: 10.20062/j.cnki.CN37-1453/N.2023.03.002

# 霍乱毒素 B 亚基与草鱼呼肠孤病毒 VP7 融合基因的合成和原核表达

王桐桐 金姗姗 韩玉行 索美涛 郭新琦 张秋胜

(鲁东大学 农学院 山东 烟台 264039)

**摘要:**草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 是一种致病力强, 严重危害水产养殖业健康发展的病毒。免疫接种疫苗是预防 GCRV 的有效途径, 而口服免疫接种对生活在水中的鱼类是一种理想的接种方式。GCRV 衣壳蛋白 VP7 具有较好的免疫原性。霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B subunit, CTB) 是一种较好的黏膜佐剂。本研究采用 PCR 技术, 将 CTB 基因和 VP7 基因进行柔性融合, 获得 1260 bp 的 CTB-VP7 融合基因, 构建重组表达质粒 pET28a-CTB-VP7, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得了表达 CTB-VP7 融合蛋白的菌株。当采用异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导时, 获得 CTB-VP7 融合蛋白的分子量约 49 kDa, 与预期的分子量大小一致。当 IPTG 浓度为  $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 诱导温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 诱导转速为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 诱导表达 5.0 h 时, CTB-VP7 融合蛋白的表达量最大, 达到  $2.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CTB-VP7 融合蛋白在菌体中主要以包涵体的形式存在。在融合蛋白纯化时, 洗脱缓冲液中咪唑浓度为  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 目标蛋白纯度达 96%。本研究通过基因合成和原核表达得到 CTB-VP7 融合蛋白, 为进一步验证 CTB-VP7 融合蛋白能否作为抵抗 GCRV 的黏膜疫苗奠定了基础。

**关键词:**草鱼呼肠孤病毒; VP7 蛋白; CTB; 黏膜疫苗; 融合表达

中图分类号: S96 文献标志码: A 文章编号: 1673-8020(2023)03-0203-06

黄河三角洲地区淡水资源丰富, 具有发展水产养殖得天独厚的优越条件。养殖草食性鱼类, 尤其草鱼, 是降低成本、增加效益、提高土地利用效率的一项重要措施。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国的主要水产养殖鱼类之一, 而草鱼出血病可致草鱼死亡率达 90%, 给我国水产养殖业带来了巨大的损失。草鱼出血病的病原是草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV), 这是由中国分离、鉴定的第一株水生动物病毒<sup>[1]</sup>。GCRV 的形态学、流行病学、理化及分子生物学等方面已进行了系统的研究<sup>[2]</sup>。当前没有有效的药物可以治疗草鱼出血病, 因此接种疫苗是目前最积极有效的方法。目前, 草鱼出血病的疫苗主要是灭活疫苗、减毒疫苗、亚单位疫苗以及 DNA 疫苗, 这些疫苗均采用注射接种<sup>[3]</sup>。这种传统的注射接种方式存在鱼类应激性强、劳动强度大等缺点, 而口服疫苗具有成本低、易接种, 适用于不

同规格的水产动物等优点, 是国内外水产疫苗的研究热点, 也是未来发展的趋势。

GCRV 病毒含有 7 种衣壳蛋白组分 (VP1 ~ VP7), 其中 VP7 蛋白是草鱼呼肠孤病毒主要的外衣壳组分, 在病毒的感染、免疫及致病过程起着非常重要的作用<sup>[4]</sup>。VP7 相对于该病毒的其他结构蛋白而言, 能使草鱼产生对 GCRV 的免疫保护, 具有较强的免疫原性<sup>[5]</sup>。因此, VP7 是用于疫苗设计的首选抗原。

霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B subunit, CTB) 是霍乱毒素的无毒亚基, 其最基本的受体神经节苷酯 (monosialoganglioside, GM1) 存在于大多数哺乳动物细胞表面, 使 CTB 具备了良好的佐剂效能<sup>[6]</sup>。CTB 能增强树突状细胞及其他抗原提呈细胞对抗原的提呈作用, 诱导机体分泌特异性抗体并刺激 T 细胞、B 细胞和抗原提呈细胞表面的受体表达<sup>[7-8]</sup>。CTB 作为免疫载体的重要功

收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-04-20

基金项目: 山东省科技攻关计划 (2018GSF121035)

通信作者简介: 张秋胜 (1974—), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向为动物病害防治。E-mail: qiushengzhang@ldu.edu.cn

能,可以使融合蛋白更易与消化道粘膜作用,产生更强的免疫效果<sup>[9]</sup>。CTB与抗原混合或构建原核载体表达CTB-抗原耦合的重组蛋白,在应用中,均获得了口服免疫保护效果<sup>[10]</sup>。因此,CTB和VP7作为融合蛋白将是口服疫苗的较好选择。

本研究将CTB基因与VP7基因结合,成功构建了CTB-VP7重组质粒,并将其转入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中,利用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其表达出CTB-VP7融合蛋白,并对其表达优化和蛋白纯化研究。利用融合抗原CTB-VP7制备粘膜疫苗,该粘膜疫苗可通过口服和浸泡的方式使草鱼的幼鱼达到免疫和更早保护的目的,同时还可以大批量免疫接种从而降低免疫成本,为GCRV的免疫防治提供了新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

pET28a、pET28a-CTB和pET28a-VP7等质粒,大肠杆菌BL21(DE3)和大肠杆菌TOP10等菌株均由本实验室保存。

### 1.2 试剂

T4 DNA连接酶、BamHI内切酶和PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase等购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购于北京全式金生物技术有限责任公司。异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、咪唑(Imidazole)、尿素(Urea)和引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 CTB-VP7基因的合成

设计含一端含BamHI酶切位点的PCR引物,序列如下:CTB-F引物:5'-GGCGGATCCATGACACCGCAGAACATCACTGACCTG-3'(下划线部分为BamHI酶切位点),CTB-R引物:5'-GTC-CACCTCCACCAGATTCACCTCCACCGTTTGCATGCTGATGGCTGCT-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以pET28a-CTB质粒为模板,CTB-F和CTB-R为引物,采用PCR扩增CTB基因。50 μL的反应体系如下:PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 25 μL; CTB-F 1.0 μL; CTB-R

1.0 μL; pET28a-CTB质粒 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 22 μL。反应条件为:98 °C变性 10 s; 55 °C复性 5 s; 72 °C延伸 10 s,共 30个循环。

根据GenBank中VP7基因序列(Accession No. AF403396)设计引物:VP-F引物:5'-CTGGTGGAGGTGGACCTGGTGGAGGTGGATCTATGCCACTTCACATGATTCCGC-3'; VP-R引物:5'-GGCGGATCCTTAATCGGATGGCTCCACATGCAAG-3',下划线部分为BamHI酶切位点。以pET28a-VP7质粒为模板,PCR扩增VP7基因。50 μL的反应体系如下:PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 25 μL; VP-F 1.0 μL; VP-R 1.0 μL; pET28a-VP7质粒 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 22 μL。反应条件同上。

将上述扩增产物分别进行琼脂糖凝胶电泳检测,并用试剂盒回收相应的目的片段,获得CTB和VP7的基因片段。将上述两种目的DNA片段等量混合为模板,以CTB-F和VP-R为引物,PCR扩增合成CTB-VP7融合基因。反应体系如下:PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 25 μL; CTB-F 1.0 μL; VP-R 1.0 μL; CTB和VP7的基因扩增片段的等体积混合物 2.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 21 μL。反应条件同上。通过琼脂糖凝胶电泳和切胶回收1.2 kb的DNA片段,置于4 °C存放备用。

### 1.4 构建表达载体与转化表达菌株

将上述所构建的CTB-VP7基因与pET28a表达载体,分别用BamHI进行酶切。酶切体系如下:10倍缓冲液 10.0 μL,目的片段 30.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 57.0 μL, BamHI 3.0 μL, 37 °C孵育 2 h,将酶切产物经凝胶电泳后进行DNA胶回收。回收后的CTB-VP7基因与pET28a载体利用T4 DNA连接酶于16 °C下连接 16 h,经PCR鉴定和测序验证,将正确的重组表达质粒pET28a-CTB-VP7在42 °C下热击 90 s,转化到表达菌株BL21(DE3)中,获得表达菌株,保藏并扩大培养。

### 1.5 CTB-VP7融合蛋白的诱导条件优化

按本实验室赵燕的方法进行条件优化<sup>[11]</sup>。分别进行IPTG浓度(0.03、0.05、0.08、0.10 mmol·L<sup>-1</sup>)、诱导时间(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h)、培养转速(100、200、300 r·min<sup>-1</sup>)、诱导温度(25、28、30、33、37 °C)等单因子条件优化实验。在上述最佳诱导表达条件下,工程菌pET28a-CTB-VP7/BL21用

IPTG 诱导表达,诱导后的菌液采用  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,收集菌体,用缓冲液( $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, and  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Imidazole, pH 值 7.9)洗涤两次,超声破碎处理后离心。分别收集离心后的上清液和沉淀物,进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.6 CTB-VP7 融合蛋白的纯化

将离心后的沉淀重悬于下列溶液中( $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, $6.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Urea, pH 值 7.9),在冰水中放置并悬浮溶解包涵体蛋白。溶解后的 CTB-VP7 融合蛋白,纯化方法包含 Ni-NTA 柱制备、平衡、上样、清洗和洗脱,参照说明书进行。洗脱缓冲液中咪唑浓度分别选择 100、200、300  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  收集各阶段的洗脱溶液,用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度。

## 2 结果

### 2.1 CTB-VP7 基因的合成

利用 PCR 扩增并分别回收了 CTB 和 VP7 基因片段,CTB 的扩增产物片段大小约为 350 bp,VP7 的扩增产物片段大小约为 900 bp。上述的 CTB 和 VP7 基因扩增片段,因 CTB-R 和 VP-F 两引物中间有 15 bp 的互补配对序列,因此 CTB 和 VP7 基因扩增片段之间就有了 15 bp 的互补序列,根据互补配对规则两个基因可以进行融合,获得了 CTB-VP7 融合基因片段,PCR 扩增产物片段大小约为 1260 bp。结果如图 1 所示。

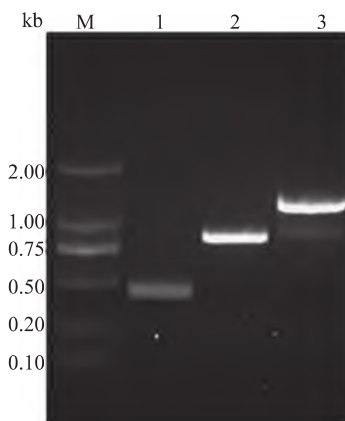


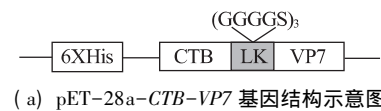
图 1 CTB-VP7 融合基因片段

注: M—DNA Maker; 1—CTB 基因; 2—VP7 基因; 3—CTB-VP7 融合基因。

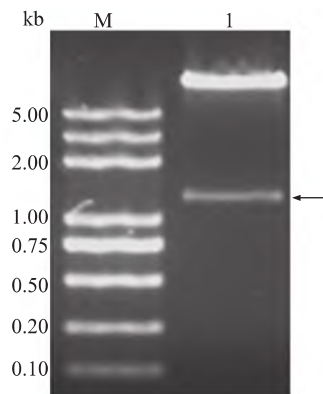
Fig. 1 The fusion gene fragment of CTB-VP7

### 2.2 构建表达载体与转化表达菌株

将上述所获得的重组基因与表达载体 pET28a, 分别进行 BamHI 酶切后再连接起来,构建的表达载体结构示意图,如图 2 (a) 所示。经测序验证正确的重组表达载体 pET28a-CTB-VP7, 再经 BamHI 酶切验证,如图 2 (b) 所示。验证正确的重组质粒 pET28a-CTB-VP7 再转化到大肠杆菌 (BL21) 中,获得表达菌株。



(a) pET-28a-CTB-VP7 基因结构示意图



(b) 酶切后的 pET-28a-CTB-VP7 重组表达载体

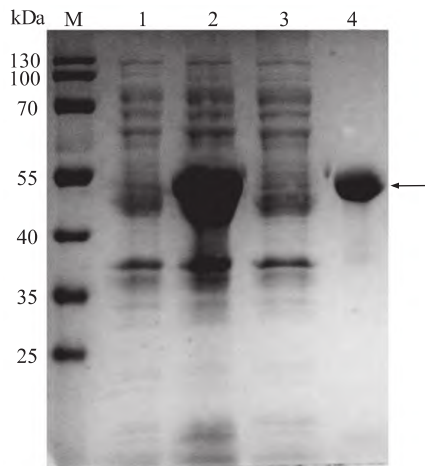
注: M: DNA Maker; 1: BamHI 酶切后的重组表达载体; 箭头所示为 CTB-VP7 融合基因。

图 2 CTB-VP7 融合基因重组表达载体的构建

Fig. 2 Construction of the expression vector of CTB-VP7 fusion gene

### 2.3 CTB-VP7 蛋白的诱导条件优化

表达菌株的菌液中加入诱导剂 IPTG 后,产生了一条特有的蛋白条带,大小为 49 kDa,与预期的分子量大小一致,说明诱导产生了 CTB-VP7 融合蛋白。当 IPTG 浓度为  $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,诱导温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,诱导转速为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,诱导表达 5.0 h 时,CTB-VP7 融合蛋白的表达量最高。经测算,CTB-VP7 融合蛋白在 1.0 L 菌体培养液中,最大的表达量可达到 2.45 mg。诱导表达后的菌液,超声破碎上清液中无 CTB-VP7 融合蛋白,CTB-VP7 融合蛋白存在于离心后的沉淀中,说明 CTB-VP7 融合蛋白主要以包涵体形式在菌体中存在的(图 3)。



注: M—蛋白 Marker; 1—诱导前样品; 2—诱导后样品; 3—超声破碎离心后的上清; 4—超声破碎离心后的沉淀; 箭头所示为 CTB-VP7 融合蛋白。

图 3 CTB-VP7 融合蛋白的表达特性

Fig. 3 Expression characteristics of CTB-VP7

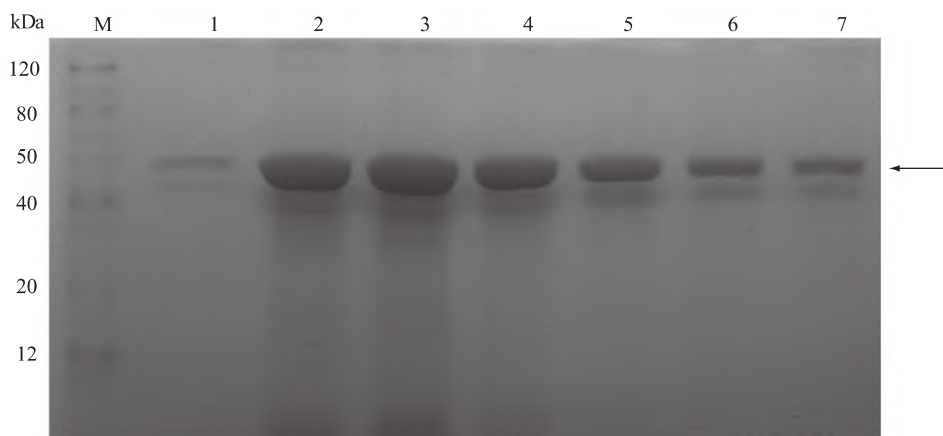
#### 2.4 CTB-VP7 融合蛋白的纯化

在菌体中形成包涵体的 CTB-VP7 融合蛋白经溶解后通过 Ni-NTA 柱纯化分离目的蛋白。随着咪唑浓度的提高, CTB-VP7 融合蛋白的洗脱效果逐步提高。当洗脱缓冲液中咪唑浓度为  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 与咪唑浓度为  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时的洗脱效率无显著差异。考虑到咪唑浓度越高, 后

续纯化成本也越高, 因此选择洗脱咪唑浓度为  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 洗脱后的 CTB-VP7 融合蛋白纯度达到 96% (图 4)。

### 3 讨论及结论

黄河流域鱼类的健康养殖, 促进了渔业可持续发展, 为推动黄河流域生态保护和高质量发展奠定了基础。近年来, GCRV 疫苗研究一直是水产病害防治的研究重点<sup>[12]</sup>。但研究多从亚单位疫苗出发, 涉及口服疫苗的研究较少, 原因在于口服疫苗的研究, 涉及鱼类生理学、鱼类营养学和鱼类疫苗学, 更涉及到分子生物学等多个学科。因此, 将分子生物学应用于 GCRV 的粘膜疫苗研究, 会提升 GCRV 的免疫防治水平。GCRV 衣壳蛋白 VP7 已被证明具有对 GCRV 的免疫保护作用<sup>[13]</sup>。另外, 本研究选用的 CTB, 除了可以作为载体蛋白外, 更是一种较强的黏膜佐剂, 当它与 VP7 融合表达的蛋白经黏膜免疫动物时, 可以有效地增强机体对特异性抗原的特异性黏膜 IgA 免疫应答和系统 IgG 免疫应答<sup>[14]</sup>。因此, 将 CTB 和 VP7 基因进行融合并成功原核表达, 是决定 CTB-VP7 融合蛋白能否作为 GCRV 粘膜疫苗的前提。



注: M 代表蛋白 Marker; 1~7 分别为纯化的第一、二、三、四、五、六、七管蛋白样品; 箭头所示为 CTB-VP7 融合蛋白。

图 4 CTB-VP7 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of CTB-VP7 protein

基因融合, 可为创制新基因和生产新的功能蛋白提供方法。基于寡核苷酸的长 DNA 序列的合成和组装, PCR 法在 1995 年被报道<sup>[15]</sup>。后来又进行了改进, 使用一种全新合成的引物实现长基因序列的高保真组装, 仍基于 PCR 的基因合成

方法<sup>[16]</sup>。然而, 直接一步合成具有复杂结构的长基因是很困难的。目前主要采用两步 DNA 合成方法, 该方法效率较高, 适合合成长片段 DNA<sup>[17]</sup>, 也可以解决基因合成的结构效应, 但价格昂贵。利用现有的基因资源合成新基因可以有

效降低成本。本研究在已有CTB和VP7基因的基础上合成CTB-VP7融合基因,具有效率高、错误率低、成本低的优点。

利用基因工程手段快速获得大量目的蛋白,特别是有重要功能的蛋白,是目前开发新产品的一种重要手段,也是今后发展的必然趋势。外源蛋白的表达水平,不仅与载体、宿主细胞和外源基因等相关,还受到诱导条件的影响。温度、IPTG浓度及诱导时间等都是影响重组蛋白表达量的重要因子。本研究所确定的最佳诱导条件为: IPTG浓度 $0.08\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,诱导温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,诱导转速 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,诱导时间 $5.0\text{ h}$ 。温度对蛋白表达量影响较大,随着温度的增加,蛋白表达量增加。因本研究选用的是大肠杆菌,而 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 是其最适宜的生长温度,这也和草鱼NEDD4(neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated 4)结合蛋白基因原核表达最佳温度条件是一致的<sup>[18]</sup>。在诱导时间上,在一定时间内,随着诱导时间的增加,蛋白表达量增加,当达到菌体表达量限度之后,随诱导时间的增加,蛋白表达量基本不变甚至减少,可能发生了蛋白降解。本研究的CTB-VP7融合蛋白在诱导 $5.0\text{ h}$ 时表达量最高,而有的融合蛋白在诱导 $9.0\text{ h}$ 时最高,这可能与不同融合蛋白的性质相关<sup>[19]</sup>。CTB-VP7融合蛋白在表达产物中以包涵体形式存在,不溶于水,也更适合其用作粘膜疫苗。在咪唑浓度为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就能获得量大且纯度高的融合蛋白,可降低进一步纯化的成本。因此,菌株表达外源蛋白的条件优化和蛋白纯化是获得大量CTB-VP7融合蛋白的基础。

基因融合和原核工程菌株表达条件的优化和蛋白纯化,为验证CTB-VP7融合蛋白作为GCRV粘膜疫苗提供了条件。GCRV粘膜疫苗的研制,可实现渔用免疫制剂的生产和接种方式的统一,降低免疫成本,解决草鱼鱼种阶段大批量免疫接种难题。

#### 参考文献:

- [1] LIMBU S M, ZHOU L, SUN S X, et al. Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk [J]. *Environment International* 2018, 115: 205-219.
- [2] LIU X, STEELE J C, MENG X Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: review [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 161-169.
- [3] 桂朗, 张奇亚. 中国水产动物病毒学研究概述 [J]. *水产学报* 2019, 43(1): 168-187.
- [4] QIU T, LU R H, ZHANG J, et al. Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus (GCRV) [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 2001, 44(1): 69-74.
- [5] 徐诗英, 李婧慧, 邹勇, 等. 草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白VP7重组疫苗的构建及其免疫效力评价 [J]. *湖南农业大学学报* 2011, 37(6): 659-664.
- [6] CHEN W, PATEL G B, YAN H, et al. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems [J]. *Human Vaccines*, 2010, 6(9): 11561.
- [7] SUN J B, CZERKINSKY C, HOLMGREN J, et al. Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2010, 71(1): 1-11.
- [8] ERIKSSON K, FREDRIKSSON M, NORDSTROM I, et al. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development [J]. *Infection and Immunity* 2003, 71(4): 1740-1747.
- [9] 郭婷夏, 方荣祥, 李国华, 等. A组轮状病毒VP6与霍乱毒素B亚基融合蛋白在大肠杆菌中的表达及生物活性分析 [J]. *生物工程学报*, 2001(6): 621-625.
- [10] WOLGEMUTH D J, JELEK M, JOBANPUTRA V, et al. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells [J]. *International Journal of Andrology* 2004, 27(4): 192-199.
- [11] 赵燕, 吕若萱, 操志晨, 等. 口服型重组草鱼生长激素基因的创建及其原核表达最佳条件研究 [J]. *鲁东大学学报(自然科学版)* 2020, 36(1): 40-47.
- [12] 方珍珠, 景丽, 江育林, 等. 草鱼呼肠孤病毒VP5蛋白的表达与纯化 [J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 508-512.
- [13] HE Y X, YANG Q, XU H X, et al. Prokaryotic expression and purification of grass carp reovirus capsid protein VP7 and its vaccine potential [J]. *African Journal of Microbiology Research* 2011, 5(13): 1643-2648.
- [14] LU L, XU H, HE Y, et al. Protection of grass carp, *Ctenopharyngon idellus* (Valenciennes), through oral administration of a subunit vaccine against reovirus [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(12): 939

- 942.
- [15] SMITH H O ,HUTCHISON C A ,PFANNKUCH C ,et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phi X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,2003 ,100 ( 26 ) : 15440-15445.
- [16] STEMMER W P C ,CRAMERI A ,HA K D ,et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides [J]. Gene , 1995 ,164( 1 ) : 49-53.
- [17] YANG J K ,CHEN FY ,YAN X X ,et al. A simple and accurate two-step long DNA sequences synthesis strategy to improve heterologous gene expression in Pichia [J]. PLoS One 2012 7( 5 ) : e36607.
- [18] 杨林,蔡佳,简纪常,等. 草鱼 NEDD4 结合蛋白基因 1 原核表达条件的优化及纯化 [J]. 广东海洋大学学报 2013 33( 4 ) : 38-42.
- [19] 张树军,狄建军,张国文. 大肠杆菌 *yfiF* 基因原核表达系统构建、表达条件优化及蛋白纯化 [J]. 生物技术 2016 26( 3 ) : 229-233.

## Synthesis and Prokaryotic Expression of the Fusion Gene of the Cholera Toxin B Subunit and Grass Carp Reovirus VP7

WANG Tongtong ,JIN Shanshan ,HAN Yuxing ,SUO Meitao ,GUO Xinqi ,ZHANG Qiusheng

( School of Agriculture ,Ludong University ,Yantai 264039 ,China)

**Abstract:** Grass carp reovirus ( GCRV ) is a type of virus with strong pathogenicity that seriously endangers the healthy development of aquaculture. Immunization is an effective way to prevent GCRV. GCRV capsid protein VP7 has good immunogenicity. Cholera toxin B subunit ( CTB ) is a good mucosal adjuvant. In this study ,the CTB gene and VP7 gene were fused by PCR technology to obtain a 1260 bp of CTB-VP7 fusion gene. The prokaryotic expression plasmid pET28a-CTB-VP7 was constructed and transformed into *E. coli*( DE3) ,and the strain expressing the CTB-VP7 fusion protein was obtained. The molecular weight of the CTB-VP7 fusion protein was 49 kDa ,which was consistent with the expected molecular weight. When the IPTG concentration was  $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,the induction temperature was  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ,the induction speed was  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  ,and the optimal induction time was 5.0 h ,the expression of CTB-VP7 fusion protein was the maximum. The expression level of CTB-VP7 fusion protein was  $2.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The CTB-VP7 fusion protein exists in the form of insoluble inclusion bodies in bacteria. When the fusion protein was purified ,the concentration of imidazole in the elution buffer was  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,and the purity of the target protein was about 96%. In this study ,CTB-VP7 fusion protein was obtained by gene synthesis and prokaryotic expression ,which lays a foundation for further verifying whether the CTB-VP7 fusion protein can be used as a mucosal vaccine against GCRV.

**Keywords:** grass carp reovirus; VP7; cholera toxin B subunit; mucosal vaccine; fusion expression

( 责任编辑 李维卫)