

日本沼虾 VASA 蛋白的原核表达、抗体制备及其免疫鉴定

崔 崢¹, 朱小玲¹, 邱高峰^{1,2*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: *Vasa* 基因具有在性腺中特异表达的特点, 在生殖细胞分化与发育过程中起重要作用。从日本沼虾精巢 cDNA 中克隆了 *vasa* 基因的阅读框, 连接到 pET-32a 载体, 构建重组表达质粒 pET32a-*vasa*, 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导融合表达, 表达产物经 SDS-PAGE 分析表明, 融合蛋白主要以包涵体形式存在, 分子量约 85 ku, 表达量约占包涵体总蛋白的 48.7%, Western-blotting 检测表明, 融合蛋白可特异地被 anti-HIS 标签抗体识别。用 Ni²⁺-NTA 纯化后的融合蛋白免疫家兔, 制备获得多克隆抗体, ELISA 显示该抗体效价达 1:160 000, Western 免疫鉴定显示该抗体不仅能识别融合蛋白, 而且也能识别日本沼虾性腺粗提液中的内源性 VASA 蛋白, 免疫组化进一步显示, VASA 蛋白主要分布在卵母细胞核周围和精原细胞质中, 成熟精子中无信号, 暗示 VASA 在日本沼虾生殖细胞发育分化过程中扮演重要角色。

关键词: 日本沼虾; VASA 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体; 免疫鉴定

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

Vasa 基因是 DEAD-box 基因家族的重要成员之一, 因其具有高度保守的 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 序列而得名^[1-3], *vasa* 基因仅在生殖细胞中特异表达, 因此被作为分子标记广泛应用于配子发生和原始生殖细胞的起源、迁移、分化等研究^[2]。VASA 蛋白具有依赖 ATP 的 RNA 解旋酶活性, 在细胞 RNA 代谢中具有重要作用, 参与 RNA 代谢的几乎所有过程, 是生殖细胞形成所需的母源性因子^[4-6]。在牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[7]、玻璃海鞘 (*Ciona intestinalis*)^[8]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[9]、金鱼 (*Carasius auratus*)^[10] 等物种的研究中显示, *vasa* 基因转录本分布在卵黄发生前期和卵黄发生期的卵母细胞细胞质中, 而在卵黄积累末期卵母细胞中未检测到, 说明 *vasa* 基因可能在卵巢的早期分化过程中具有重要作用, 但其作用机理仍不明确。

在甲壳动物, 已报道了罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)^[11]、凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*)^[12] 和中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[13] *vasa* 基因的全长 cDNA 序列, 并采用原位杂交的方法定位了 *vasa* mRNA 在性腺发育中的分布, 我们研究组之前也克隆了日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) *vasa* 基因, 证实了 *vasa* mRNA 仅在生殖细胞中特异表达, 但甲壳动物 VASA 蛋白的相关研究至今在国内外均未见报道。本研究构建了日本沼虾 VASA 蛋白原核表达质粒 pET32a-*vasa*, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中得到高效表达的重组 VASA 蛋白, 目的蛋白经纯化, 制备了兔抗 VASA 多克隆抗体, 并且对抗体进行了免疫学鉴定, 为进一步从蛋白水平研究日本沼虾生殖细胞的分化提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

日本沼虾购自当地的水产市场。大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21 为本实验室保存, 载体 pET32a、IPTG、辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG 二抗购

收稿日期: 2010-03-31 修回日期: 2010-06-18

资助项目: 上海市浦江人才计划项目 (08PJ1409000); 上海市科委自然科学基金项目 (07JR14102); 上海市教委重点学科建设项目 (J50701); 上海市教委科研创新项目 (08ZZ80)

通讯作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

买于北京鼎国生物技术有限公司,限制性内切酶 *Bam*H I和 *Eco*R I、*T*₄ DNA ligase、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、RNA 提取试剂盒、first strand cDNA synthesis kit 购自 TaKaRa, Bradford 蛋白定量试剂盒、低分子量蛋白 Marker、SDS-PAGE 各组分、anti-His antibody 购自北京天根生化公司、免疫组化 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

vasa 基因的扩增 利用 TRIzol Reagent (Invitrogen) 提取日本沼虾精巢总 RNA, 经 DNase I (Sigma) 处理后进行反转录, 获取的 cDNA 作为扩增 *vasa* 基因的模板。根据本实验室克隆的日本沼虾 *vasa* 基因全长 cDNA 序列, 利用 Primer5 软件设计特异性引物(由上海生工合成), 扩增 *vasa* 编码区序列。上游引物 AF: 5'-CGGGATCCATGTCTGATTGGGAGGACAG-3', 下游引物 AR: 5'-CGCGAATTCCTACTAGGCATCCCAGTCATCAT-3', 其中, 在这对引物的 5' 端分别加入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点(下划线标出), 下游引物的终止密码子用粗体字标出。反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 2 min 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

原核表达载体构建及大肠杆菌诱导表达 PCR 产物经过柱纯化后(Omega), 与 pET32a 载体分别经过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切(37 °C, 2 h), 酶切产物纯化后, 16 °C 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆菌落经双酶切鉴定和测序(上海鼎安), 确定插入片段序列正确性, 阳性菌落经扩大培养, 抽提重组质粒(pET32a-*vasa*)。重组质粒转化 BL21 感受态, 涂布含 *Amp*⁺ 的 LB(培养基中含有浓度为 60 μ g/mL 的 *Amp*⁺) 平板, 挑取单个菌落, 接种于含 *Amp*⁺ (终浓度为 60 μ g/mL) 的液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1:100 的比例扩大培养, 至 OD₆₀₀ 介于 0.6 ~ 0.8, 加 IPTG 诱导表达。

表达条件的优化 IPTG 设 0.2、0.5、0.8、1.0 mmol/L 4 个浓度, 分别在 30 °C 和 37 °C 下诱导, 确定最佳诱导剂浓度和表达温度。大量诱导表达的菌体经离心收集(5 000 r/min, 5 min, 4 °C), 1 \times PBS 重悬菌体后在冰浴条件下超声破碎(超声时间 4 s, 间歇时间 4 s, 保护温度 24 °C, 总时间 60 次)。12 000 r/min 离心 10 min, 分别取适量离心

后的上清和 8 mol/L 尿素重悬后的沉淀进行 SDS-PAGE 分析(5% 浓缩胶, 12% 分离胶), 经考马斯亮蓝 R250 染色 1 ~ 2 h, 过夜脱色后观察结果。

Western-blotting 检测融合蛋白 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用 Bio-Rad 电转移系统将目的蛋白转移到 NC 膜上。用含有 10% 小牛血清的 TTBS [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.05% (V/V) Tween-20] 封闭 1 h 后, 依次用抗 His 标签的单抗为一抗、HRP 标记的羊抗鼠免疫球蛋白 IgG 为二抗, 对其进行免疫分析, 经显色液(DAB 15 mg、甲醇 5 mL、30% 双氧水 15 μ L) 处理, 显色适当(15 ~ 20 min) 时水洗终止反应并观察结果。

菌体蛋白的定量分析及目的蛋白含量的检测 100 mL 的培养液离心收集菌体, 超声破碎, 冷冻离心后用 10 mL 含 8 mol/L 尿素的磷酸钠缓冲液溶解沉淀, 按照 Bradford 定量试剂盒的说明书对菌体蛋白进行定量分析。Quantity One 软件分析 SDS-PAGE 电泳的条带, 得出目的蛋白的相对浓度, 粗略计算出诱导表达后目的蛋白的总含量。

VASA 多克隆抗体的制备及检测 根据 Sigma 公司 His-selectTM Spin Columns 的产品说明, 纯化目的蛋白。用含 8 mol/L 尿素的磷酸钠缓冲液溶解包涵体, 取适量(500 μ L) 加到已被平衡液(0.1 mol/L 磷酸钠、8 mol/L 尿素, pH 8.0) 处理过的 His-selectTM Spin Columns 柱子中, 室温静置 1 h 后离心(2 000 r/min, 2 min), 收集离心后的流出液, 做进一步的分析。将柱子用漂洗液(0.1 mol/L 磷酸钠、8 mol/L 尿素, pH 8.0) 冲洗两次(每次 600 μ L, 2000 r/min 离心 2 min) 后洗脱(0.1 mol/L 磷酸钠、8 mol/L 尿素, pH 4.0 ~ 6.0) 目的蛋白。取纯化后的重组蛋白 500 μ g 与等量弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后采用背部多点注射法免疫家兔(免疫前采集正常血清作为阴性对照), 两周后取同量纯化蛋白(和首次免疫量相同) 与等量弗氏不完全佐剂混合, 进行加强免疫, 以后每 2 周免疫一次, 共 4 次, 最后一次加强免疫 8 d 后, 处死采血, 分离血清, -20 °C 保存, 抗血清做 ELISA 检测以测定效价。

组织蛋白的提取以及抗血清的检测 分别将约 50 mg 的日本沼虾精巢和卵巢组织置于 1 mL 的 3 \times SDS 溶液中充分研磨, 研磨后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 获得组织蛋

白粗提液。重组蛋白和组织蛋白粗提液分别经过 SDS-PAGE 电泳后进行 Western-blotting 分析,方法同上,一抗为适当稀释的 VASA 抗血清,二抗为辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG。

免疫组化 精巢和卵巢组织经石蜡包埋后进行常规切片,切片脱蜡至复水后,用 3% 的 H_2O_2 室温处理 5 ~ 10 min,蒸馏水冲洗后滴加 5% BSA,室温放置 20 min,适量滴加一抗,37 °C 放置 1 h 后用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。滴加辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG,室温放置 20 min 后 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。然后滴加 SABC,室温放置 20 min 后 PBS 冲洗 4 次,每次 5 min,最后用 DAB 显色。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增及原核表达载体的构建

PCR 扩增出 1 条 1 800 bp 的条带,与预期目的片段大小相近(图 1)。重组质粒双酶切后检测,显示在 1 800 bp 处有目的条带(图 2),挑取阳性菌落扩大培养送上海生工生物工程公司测序,测序结果和本实验室之前获得的 *vasa* 基因全长

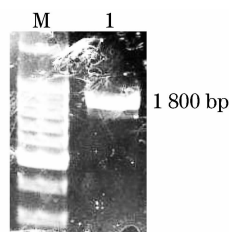


图 1 *vasa* 基因编码框的 PCR 扩增

M. DNA marker; 1. PCR 产物。

Fig. 1 PCR amplification of the *vasa* open reading frame (ORF)

M. DNA marker; 1. PCR products.

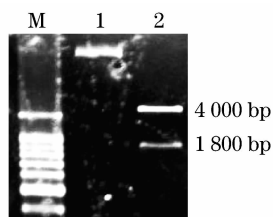


图 2 重组质粒 pET32a-vasa 的酶切图谱

M. DNA marker; 1. pET32a-vasa 重组质粒; 2. 重组质粒双酶切产物。

Fig. 2 Restriction mapping analysis of the recombinant pET32a-vasa

M. DNA marker; 1. the recombinant plasmid pET32a-vasa; 2. pET32a-vasa digested by *EcoR* I and *BamH* I.

cDNA 序列中的开放式阅读框 (ORF) 完全一致,编码 600 个氨基酸,将此阳性重组表达载体质粒命名为 pET32a-vasa。

2.2 重组蛋白的表达与检测

pET32a-vasa 转化大肠杆菌 BL21 后,经 IPTG 诱导表达,表达产物进行 SDS-PAGE 检测,只在沉淀的菌体蛋白中发现有一条明显加粗的条带,大小与预测的重组蛋白分子量相近,约 85 ku (图 3),而在上清中则无相应的条带,表明融合蛋白主要以包涵体形式存在。通过对表达条件的优化显示,温度对目的蛋白的表达具有一定影响,VASA 蛋白在 30 °C 的表达量明显高于在 37 °C 的表达量(图 3);IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L,重组蛋白便能大量表达,增加 IPTG 浓度对表达量没有明显影响(图 4);加入 IPTG 2 h 后可检测到目的条带,表达量和诱导时间成正比(图 5)。

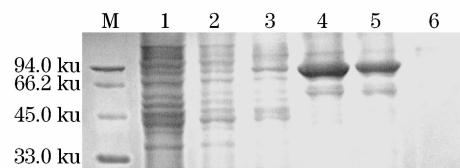


图 3 pET32a-vasa 融合蛋白表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

M. 蛋白分子量 marker; 1. 空质粒诱导; 2. 空质粒未诱导; 3. 重组质粒未诱导; 4. 30 °C 诱导 6 h; 5. 37 °C 诱导 6 h; 6. 重组质粒诱导 6 h 后上清。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein pET32-vasa

M. protein molecular marker; 1. pET32a induced; 2. pET32a uninduced; 3. pET32a-vasa uninduced; 4. 30 °C induced for 6 h; 5. 37 °C induced for 6 h; 6. supernatant of induced pET32a-vasa after supersonic.

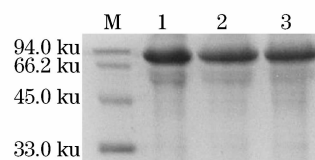


图 4 融合蛋白表达的最佳 IPTG 浓度

M. 蛋白分子量标记; 1. 30 °C IPTG 终浓度 0.2 mmol/L, 6 h; 2. 30 °C IPTG 终浓度 0.5 mmol/L, 6 h; 3. 30 °C IPTG 终浓度 1 mmol/L, 6 h。

Fig. 4 Optimum IPTG concentration for recombinant expression

M. marker; 1. IPTG 0.2 mmol/L, 30 °C; 2. IPTG 0.5 mmol/L, 30 °C; 3. IPTG 1 mmol/L, 30 °C.

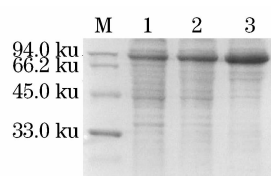


图5 诱导表达时间的优化

M. marker; 1. 诱导 2 h; 2. 诱导 4 h; 3. 诱导 6 h。

Fig. 5 Time course expression of recombinant protein

M. marker; 1. induced for 2 h; 2. induced for 4 h; 3. induced for 6 h.

通过 Bradford 定量试剂盒测定,溶解在 8 mol/L 尿素中的包涵体浓度约为 477 $\mu\text{g}/\text{mL}$, SDS-PAGE 电泳图用 Quantity One (Bio-Rad) 分析,显示在优化的诱导条件下(30 $^{\circ}\text{C}$ 、IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L),目的蛋白占包涵体总量的 48.7%,从而可计算出在该条件下,100 mL 的培养基中目的蛋白表达量约为 2.32 mg。

将重组蛋白用抗 His 标签的抗体作为一抗进行 Western-blotting 分析,在 85 ku 附近检测到特异性目的条带(图 6)。

2.3 VASA 抗体的制备与免疫鉴定

用纯化后的重组 VASA 蛋白免疫 3 只家兔,第 4 次免疫后的抗血清用包被有重组 VASA 蛋白(每孔用 100 μL 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗原包被)

的酶标板进行间接 ELISA 反应,用酶标仪读取 450 nm 下的光吸收值,吸光度(OD 值),结果显示,3 只兔在第 4 次加强免疫后,其血清分别在 1:40 000、1:160 000 和 1:10 000 的稀释度下,OD 值大于 1.000(表 1)。Western-blotting 分析发现,VASA 抗血清不仅能特异识别重组蛋白(分子量 85 ku 左右)(图 7),而且还能识别卵巢和精巢中的 VASA 蛋白,分子量 70 ku 左右(图 8),与 cDNA 推算的蛋白分子量相近。重组 VASA 蛋白中,包含有一段大约为 15 ku 的 His 标签,因此分子量较组织中的 VASA 蛋白分子量大。



图6 Western-blotting 检测重组蛋白以 His 标签抗体作为一抗

1. 重组质粒诱导; 2. 空质粒诱导。

Fig. 6 Recombinant protein detected by Western-blotting using His-tag antibody

1. pET32a-vasa induced; 2. pET-32a induced.

表 1 ELISA 法检测抗体效价
Tab. 1 Antibody titre analysis using ELISA

	稀释度 dilution						
	1:2 500	1:5 000	1:10 000	1:20 000	1:40 000	1:80 000	1:160 000
Rabbit 1 serum	2.346	2.329	2.279	2.083	1.421	0.779	0.459
Rabbit 1 negative	0.082	0.065	0.065	0.063	0.055	0.062	0.060
Rabbit 2 serum	2.431	2.411	2.401	2.391	2.323	2.227	1.871
Rabbit 2 negative	0.057	0.067	0.084	0.074	0.064	0.065	0.078
Rabbit 3 serum	2.231	1.930	1.321	0.734	0.404	0.232	0.137
Rabbit 3 negative	0.087	0.074	0.079	0.086	0.100	0.081	0.071



图7 Western-blotting 检测重组蛋白以 VASA 兔抗血清作为一抗

Fig. 7 Recombinant protein detected by Western-blotting using rabbit anti-VASA serum as the primary antibody

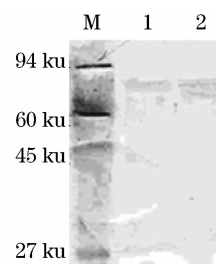


图8 Western-blotting 检测卵巢和精巢中的 VASA 蛋白

M. marker; 1. 卵巢; 2. 精巢。

Fig. 8 Detection of VASA in ovary and testis by Western-blotting using rabbit anti-VASA serum

M. marker; 1. ovary; 2. testis.

免疫组化分析进一步证明,日本沼虾 VASA 蛋白在卵巢和精巢中都有表达,VASA 蛋白在卵黄发生前期的卵母细胞的细胞质中均匀分布,在卵黄发生期的卵母细胞中,VASA 信号主要集中于细胞核周围;精巢组织切片中,在精原细胞质中能检测到很强的 VASA 信号,精母细胞次之,而精子中无信号(图 9)。

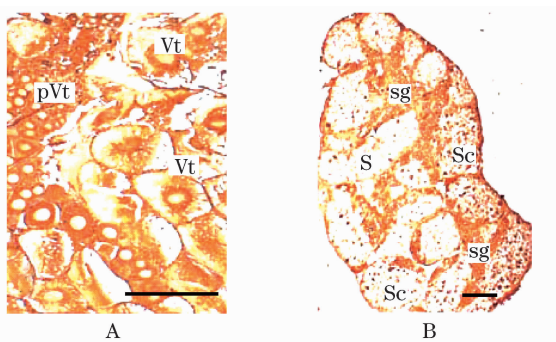


图 9 利用 VASA 兔抗多克隆抗体进行免疫组化分析、定位日本沼虾卵巢(A)和精巢(B)中 VASA 蛋白分布 pVt:卵黄发生前期卵母细胞; Vt:卵黄发生期卵母细胞; Sc:精母细胞; Sg:精原细胞; S:精子; 标尺代表 100 μm 。

Fig. 9 Localization of VASA protein in the prawn ovary (A) and testis (B) by immunohistochemistry analysis using the rabbit polyclonal antibody of VASA
pVt: previtellogenic oocyte; Vt: vitellogenic oocyte; Sc: spermatocyte; Sg: spermatogonia; S: sperm. The scale bar indicates 100 μm .

3 讨论

Vasa 基因首次从果蝇中被发现,经证实存在生殖腺中表达^[14-16],为了克隆日本沼虾 *vasa* 基因,本研究以日本沼虾精巢为材料,利用体外反转录 PCR 的方法成功克隆出日本沼虾 *vasa* cDNA 阅读框全长序列,序列两端添加有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点,便于酶切后和表达质粒连接。对日本沼虾 *vasa* 基因序列进行大肠杆菌密码子偏爱性分析,发现序列中没有大肠杆菌稀有密码子,密码子的分配情况与大肠杆菌相似,不影响该基因的表达水平。

pET-32a 为含有 T_7 启动子和氨苄抗性基因的原核高效表达载体,所获得的蛋白适合于多种用途,包括抗体制备等。当培养基中含有 IPTG 时,在合适的温度条件下,能诱导重组蛋白大量表达。为了节省 IPTG 的使用量,降低实验成本,本研究探索了不同 IPTG 诱导物浓度对蛋白质表达

量的影响,结果表明,IPTG 浓度在 0.2 ~ 1.0 mmol/L,蛋白表达量并没有明显差别,故大量表达 VASA 蛋白时,采用 0.2 mmol/L IPTG 诱导。该载体的表达产物带有 6 个组氨酸标签,便于 Ni-NTA 金属亲和层析柱纯化回收该重组蛋白^[17]。对表达产物进行 SDS-PAGE 分析,融合蛋白主要以包涵体形式存在,30 $^{\circ}\text{C}$ 的表达量明显高于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的表达量。VASA 蛋白经过纯化后免疫家兔,得到了效价高、特异性强的抗体,抗体效价最高达到 1:160 000,经 Western-blotting 鉴定,该抗体不仅能识别重组 VASA 蛋白,也能识别内源性 VASA 蛋白(图 7,图 8)。

免疫组化实验结果进一步显示,VASA 存在于日本沼虾卵母细胞发育整个过程,在卵黄生成作用前的卵母细胞中,VASA 蛋白均一地分布在细胞质中,而随着发育的进行,在卵黄发生期的卵母细胞中,VASA 蛋白集中于细胞核四周,精巢切片免疫组化显示,VASA 信号主要位于精原细胞和精母细胞中,精子中没有检测到信号。这一结果和银鲫^[18]中的结果吻合,而不同于鼠类精巢中 VASA 蛋白的分布情况,在鼠类精巢的研究中,VASA 蛋白仅定位在精母细胞和精细胞的核周^[19]。日本沼虾性腺中 VASA 蛋白的分布情况,暗示着 VASA 蛋白在生殖细胞早期的分化、配子形成过程中可能起重要作用。此外,还说明 VASA 蛋白更有可能作为一种母源性的遗传物质,经由卵母细胞传递到胚胎中,在胚胎发育过程中发挥重要作用。之前报道的罗氏沼虾卵巢和精巢组织原位杂交的结果显示,*vasa* mRNA 与 VASA 蛋白的分布基本相似,也存在于各个发育时期的卵母细胞。在卵黄积累过程中的卵母细胞内,*vasa* 信号主要集中在核膜周围,而在成熟的卵母细胞中,*vasa* 转录本主要存在于核质中,但在精巢组织,*vasa* mRNA 不仅分布在精原细胞、精母细胞的细胞质中,而且在精子中也检测到了 *vasa* 转录本的存在^[11],说明 *vasa* mRNA 与 VASA 蛋白的表达具有时空性,也可能是由于 *vasa* 转录本和 VASA 蛋白的分布方式具有种的特异性。

在对鸡的研究中,研究者不仅定位了 VASA 蛋白在性腺中的分布,而且从卵裂期胚胎开始便检测到 VASA 蛋白,通过追踪 VASA 蛋白,揭示了鸡胚胎发育过程中性腺的分化和发育^[20]。日本沼虾胚胎发育过程中,原始生殖细胞何时产生、如何转移到原始生殖嵴附近以及性腺如何开始分

化和发育,这些问题还有待于进一步研究,本研究制备的兔抗日本沼虾 VASA 抗体,可为追踪原始生殖细胞的产生进而探究日本沼虾性别分化和发育机制提供重要的物质基础。

参考文献:

- [1] Linder P, Lasko P F, Ashburner M, *et al.* Birth of the D-E-A-D box [J]. *Nature*, 1989, 337 (6203): 121 - 122.
- [2] Lasko P F, Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A [J]. *Nature*, 1988, 335 (6191): 611 - 617.
- [3] Leroy P, Alzari P, Sassoon D, *et al.* The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase [J]. *Cell*, 1989, 57(4) : 549 - 559.
- [4] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases [J]. *Cell*, 1988, 55(4) : 577 - 587.
- [5] Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P. Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities [J]. *Development*, 1994, 120 (5): 1201 - 1211.
- [6] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells [J]. *Development*, 1997, 124 (16): 3157 - 3165.
- [7] Fabioux C, Pouvreau S, Le Roux F, *et al.* The oyster vasa-like gene; a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4) : 897 - 904.
- [8] Fujimura M, Takamura K. Characterization of an ascidian DEAD-box gene, Ci-DEAD1: specific expression in the germ cells and its mRNA localization in the posterior-most blastomeres in early embryos [J]. *Dev Genes Evol*, 2000, 210 (2): 64 - 72.
- [9] Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, *et al.* The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Dev Growth Differ*, 2000, 42(4) : 317 - 326.
- [10] 陈云贵, 叶鼎, 宋平, 等. 金鱼配子发生中 vasa 基因的表达和分布特征 [J]. *动物学研究*, 2005, 26(2) : 179 - 183.
- [11] Nakkrasae L I, Damrongphol P. A vasa-like gene in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74 (7): 835 - 842.
- [12] Aflalo E D, Bakhrat A, Raviv S, *et al.* Characterization of a vasa-like gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(2) : 172 - 177.
- [13] Zhou Q R, Shao M Y, Qin Z K, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of the DEAD-box family genes, *Fc-vasa* and *Fc-P110a*, in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1) : 37 - 45.
- [14] Olsen L C, Aasland R, Fjose A. A vasa-like gene in Zebrafish identifies putative primordial germ cells [J]. *Mech Dev*, 1997, 66(1 - 2) : 95 - 105.
- [15] Aflalo E D, Bakhrat A, Raviv S, *et al.* Characterization of a vasa-like gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(2) : 172 - 177.
- [16] Chang C C, Dearden P, Akam M. Germ line development in the grasshopper *Schistocerca gregaria*; vasa as a marker [J]. *Dev Biol*, 2002, 252 (1): 100 - 118.
- [17] 徐江红, 陈兵, 张德广, 等. 肺炎链球菌自溶素基因的克隆、表达及蛋白纯化 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2009, 36(2) : 191 - 194.
- [18] Xu H Y, Peng J X, Gui J F, *et al.* Gibel carp germ cell marker Vasa: cDNA cloning and its antibody preparation [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, 51(4) : 732 - 742.
- [19] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, *et al.* Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(25) : 12258 - 12262.
- [20] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, *et al.* Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells [J]. *Development*, 2000, 127 (12): 2741 - 2750.

Prokaryotic expression, antibody preparation and immunological characterization of VASA protein in the prawn *Macrobrachium nipponense*

CUI Zheng¹, ZHU Xiao-ling¹, QIU Gao-feng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Vasa gene is specifically expressed in gonads and plays an important role in the germline formation and differentiation in most animals. In this study, a full open reading frame of *vasa* gene was amplified from the testis cDNA pool of the prawn *Macrobrachium nipponense*, and ligated with expression plasmid pET32a with 6 × histine tag. After the recombinant plasmid was transferred into host bacteria *Escherichia coli*(BL21), the recombinant VASA protein was expressed under the induction of IPTG. The optimum concentration of IPTG was 0.2 mmol/L with a duration of 6 h at 30 °C. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was highly expressed as inclusion body and the yield accounted for 48.7% of the total bacterial protein. Western-blotting analysis demonstrated the target protein with the molecular weight of 85 ku. The recombinant protein was subsequently purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. To further prepare the prawn VASA antibody, New Zealand white rabbits were immunized by the purified protein. The highest titer of the antisera was up to 1:160 000 as revealed by ELISA assay. The specificity of the antibodies against VASA protein was verified by Western-blotting. Immunohistochemical analyses indicated that, in oocyte VASA protein was mainly concentrated at the perinuclear region at vitellogenic oocyte; in testis, VASA protein was mainly distributed in spermatogonia. These data suggest that the VASA could play a key role in the development and differentiation of the germ cells in the prawn.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; VASA protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody; immunological characterization

Corresponding author: QIU Gao-feng. E-mail: gfqiu@shou.edu.cn