

文章编号: 1000-0615(2018)08-1181-08

DOI: 10.11964/jfc.20170810926

## 河南华溪蟹生殖调控分子VASA的原核表达、 抗体制备及免疫鉴定

杜晓琳, 王兰\*, 孙敏\*

(山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

**摘要:** 为了研究生殖调控分子VASA在河南华溪蟹性腺发育过程中的表达模式和功能, 本研究制备了VASA蛋白特异的多克隆抗体。选取河南华溪蟹 $vasa$ 基因813 bp的特异区段, 克隆到pET32a载体, 构建了原核表达载体pET32a- $Shvasa$ , 转化至大肠杆菌BL21, 经IPTG诱导表达和SDS-PAGE检测。结果显示, 47 ku的VASA融合蛋白在菌液上清液中大量存在。VASA融合蛋白经Ni-NTA His-Bind亲和层析柱分离纯化后, 免疫新西兰大白兔, 制备了河南华溪蟹VASA蛋白的多克隆抗体。ELISA检测显示, VASA蛋白多克隆抗体的效价高达 $1.0 \times 10^5$ 。进一步通过免疫吸附实验和Western blot方法鉴定抗体特异性, 研究表明, 获得的多克隆抗体不仅能识别VASA融合蛋白, 而且能特异识别河南华溪蟹卵巢中的天然VASA蛋白。研究为鉴定河南华溪蟹及其他蟹类生殖细胞提供了有效手段, 为进一步解析十足目动物VASA蛋白的功能提供了分子基础。

**关键词:** 河南华溪蟹; VASA蛋白; 原核表达; 抗体制备; 免疫鉴定

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

$vasa$ 基因首次报道于果蝇(*Drosophila*)中, 在生殖调控中发挥重要功能<sup>[1-7]</sup>。 $vasa$ 基因编码的蛋白包含高度保守的DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)序列, 是DEAD-box蛋白家族成员<sup>[1, 8]</sup>。VASA蛋白具有依赖ATP的RNA解旋酶活性, 几乎参与了RNA代谢的全部过程, 是生殖细胞形成所必须的母源因子<sup>[2-5]</sup>。 $vasa$ 作为原生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)的标记分子, 被广泛用于研究PGCs的迁移、分化及生殖细胞的发生<sup>[3-7]</sup>。果蝇<sup>[3]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[7]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[9]</sup>、人(*Homo sapiens*)<sup>[10]</sup>等生物中,  $vasa$ 基因的功能研究已较为成熟。文献报道显示, 果蝇 $vasa$ 基因突变引起卵子发生过程受阻, 造成雌性果蝇不育<sup>[11]</sup>; 雄鼠 $vasa$ 基因功能丧失, 导致雄性生殖细胞的增殖和分化被抑制, 甚至引起不育<sup>[12]</sup>。

甲壳动物中, 陆续克隆了 $vasa$ 基因的cDNA全长序列。研究表明,  $vasa$  RNA在中华绒螯蟹

(*Eriocheir sinensis*)<sup>[13]</sup>、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)<sup>[14]</sup>、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[15]</sup>、大型溞(*Daphnia magna*)<sup>[16]</sup>的性腺组织中特异性表达。Nakkrasae等<sup>[17]</sup>、Aflalo等<sup>[18]</sup>、Zhou等<sup>[15]</sup>及Wang等<sup>[14]</sup>采用原位杂交方法, 分别在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾和拟穴青蟹中检测到 $vasa$  RNA在早期卵母细胞细胞质中分布, 随着卵母细胞的发育, 逐渐聚集到细胞核; 精巢中,  $vasa$  RNA仅分布在精原细胞和精母细胞的细胞质中。有关VASA蛋白的研究, 目前仅在日本沼虾(*M. nipponensis*)中有报道。崔峥等<sup>[19]</sup>制备了VASA蛋白多克隆抗体, 对其蛋白进行了研究, 结果表明, 日本沼虾VASA蛋白在性腺中特异性表达, 并且主要分布在卵母细胞核的周围及精原细胞的细胞质中<sup>[19]</sup>。但是, 至今为止, 蟹类中

收稿日期: 2017-08-14 修回日期: 2018-03-21

资助项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20131401120009)

通信作者: 王兰, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn; 孙敏, E-mail: sunm1112@163.com

VASA蛋白的表达模式及其在生殖细胞中的功能仍不清楚。本研究在前期克隆的部分河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*) *vasa*基因(*Shvasa*)序列的基础上<sup>[20]</sup>, 通过构建pET32a-*Shvasa*表达载体, 成功表达了VASA融合蛋白, 并制备了河南华溪蟹VASA蛋白(ShVASA)特异的多克隆抗体。进一步对制备的抗体进行了免疫鉴定, 证实获得的多克隆抗体能够特异识别ShVASA蛋白, 为蟹类VASA蛋白生物学功能的研究和生殖细胞的鉴定提供了有效手段, 为探讨华溪蟹卵子发生的分子调控机理提供了重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

河南华溪蟹购自太原五龙口水产批发市场, 置实验室水族缸(50 cm×30 cm×25 cm)中暂养(曝气水, pH=7.4, 溶氧量8.0~8.3 mg/L, 水深3~4 cm, 水温20~22 °C), 每周换水3次, 喂食3次, 选取体质量相近(18.22±0.96) g, 且性腺发育早期的河南华溪蟹取材、检测。pET32a表达载体、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α和BL21 (DE3)菌株购自北京全式金生物技术有限公司。pMD-19T (simple)、T<sub>4</sub> DNA连接酶购自TaKaRa公司。质粒抽提试剂盒购自OMEGA公司; 2×Easy-Taq DNA聚合酶购自康为世纪生物科技有限公司; 限制性内切酶*EcoR* I和*Xho* I购自NEB公司; Bradford蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE组分[Tris-HCl(pH 8.8、6.8)、30%丙烯酰胺]、组织蛋白抽提液、超敏底物ECL化学发光液购自北京索莱宝科技有限公司; Ni-NTA His-Bind Resin购自Novagen公司; PVDF膜(0.22 μm)购自Sigma公司; HRP标记山羊抗兔IgG购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 *vasa*表达序列的扩增

以本实验室河南华溪蟹*vasa*基因的部分序列为模板, 利用Primer 5.0软件设计特异性引物(表1), 扩增*vasa*基因序列。其中, 引物的5'端分别加入*EcoR* I和*Xho* I酶切位点(下划线标出), PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s、59 °C 30 s、72 °C 50 s, 共35个循环; 72 °C终延伸10 min, 琼脂糖凝胶电泳检测。

表1 表达序列PCR扩增引物

Tab. 1 PCR amplification primer of the expression sequence

	引物 primer	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')
上游引物	VexpF	5' <u>CGGAATTC</u> ATGCATGGATGAGGA CTGGGAAGC3'
下游引物	VexpR	5'CGCT <u>CGAGG</u> GGCTTTCATCACAT TTTCAAGC3'

注: *EcoR* I和*Xho* I限制性内切酶酶切位点用下划线标出

Notes: *EcoR* I and *Xho* I restriction endonuclease sites are marked by underline

### 1.3 原核表达载体的构建

回收PCR产物(TaKaRa), 与pMD-19T(simple)连接[T<sub>4</sub> DNA连接酶(TaKaRa)], 4 °C过夜, 转化, 送生工生物工程(上海)股份公司测序验证。提取pMD-19T-*vasa*和pET-32a载体, 分别用*EcoR* I和*Xho* I双酶切(37 °C, 2 h), 琼脂糖凝胶电泳检测。酶切产物经纯化后, 将*vasa*基因与pET32a连接, 连接产物转化大肠杆菌DH5α, 挑选阳性克隆, 再次测序验证(n=5), 成功构建了河南华溪蟹*vasa*原核表达载体pET32a-*Shvasa*。

### 1.4 大肠杆菌的诱导表达

重组载体(pET32a-*Shvasa*)转化至BL21感受态细胞中, 涂布于LB平板培养基(氨苄浓度为1 mg/mL), 挑取单菌落, 接种于LB液体培养基(氨苄浓度为1 mg/mL), 37 °C振荡培养过夜, 次日按1: 50的比例扩大培养, 至菌液OD<sub>600</sub>介于0.67~0.7; 1 mmol/mL IPTG诱导表达(37 °C, 4 h)。10 000 r/min, 4 °C离心10 min, 弃上清液, 1×PBS缓冲溶液重悬菌体, 在冰浴条件下超声破碎(超声时间2 s, 间歇时间3 s, 总时间2 h), 10 000 r/min离心10 min, 取20 μL离心后的上清液和1×PBS缓冲溶液重悬后的沉淀进行SDS-PAGE分析(5%浓缩胶, 12%分离胶), 考马斯亮蓝R250染色1 h, 过夜脱色, 拍照。实验重复3次。

### 1.5 融合蛋白的纯化、多克隆抗体的制备及效价测定

Ni-NTA His-Bind亲和层析柱纯化河南华溪蟹VASA融合蛋白, 选用50、100、150 mmol/mL咪唑浓度洗脱, 收集蛋白, SDS-PAGE检测。纯化后的融合蛋白[200 μg/(次·只)的剂量]加入完全弗氏佐剂乳化, 对成年健康新西兰大白兔背部进行多点皮下注射。2~3次加强免疫后取血清。

包被液稀释抗原(VASA融合蛋白终浓度为2 μg/mL, 100 μL/孔), 多克隆抗血清(从200倍开始2倍梯度稀释)进行ELISA反应。酶标仪读取450 nm和630 nm的吸光值, 分析抗体效价。

### 1.6 免疫吸附实验

将抗血清与纯化的融合蛋白混合于TBST中(0.1%奶粉溶液配制), 4 °C条件下摇床孵育16 h, 13 053 r/min离心20 min, 取上清液, Western blot检测, 重复3次以上。对抗原抗体的浓度比例进行多次摸索, 在初步确定1:2、1:5、1:10浓度的基础上, 再经检测和验证, 确定抗原抗体比例为1:10为最佳吸附条件, 用于后续实验。

### 1.7 Western blot检测抗体特异性

组织蛋白抽提液(索莱宝)抽提卵巢、鳃总蛋白。50 mg组织中加入1 mL组织蛋白抽提液, 冰上充分匀浆后, 12 000 r/min 4 °C离心10 min, 取上清液。提取的总蛋白加4×Loading buffer于金属浴煮沸10 min使蛋白变性。取20 μL的总蛋白经12% SDS-PAGE电泳, 电转移系统转至PVDF膜, 5%牛奶10 mL TBST中封闭2 h。一抗孵育, 4 °C过夜[1:1 000稀释的阳性血清、免疫前的血清(分别来自2只兔子)、免疫吸附后的血清], TBST缓冲液洗涤3次, 每次10 min。二抗孵育(1:1 000稀释的HRP标记的山羊抗兔IgG), TBST缓冲液洗涤3次, 每次10 min, 显影(超敏底物ECL化学发光液)、观察、拍照。实验重复3次以上。

## 2 结果

### 2.1 表达序列的PCR扩增及原核表达载体的构建

分别以河南华溪蟹卵巢和精巢cDNA为模板进行PCR扩增, 获得了与预期大小一致的特异性条带(图1), 经测序分析, 均为813 bp的vasa序列。产物连接至pMD19T (simple), 得到重组载体pMD19T-*Shvasa*, 将该重组载体与表达载体pET32a分别用限制性内切酶EcoR I和Xho I进行双酶切。酶切产物经电泳检测, pMD19T-*Shvasa*双酶切后, 得到的800 bp左右的电泳条带即为vasa的基因序列; pET32a空载体经双酶切后, 得到5 900 bp左右的条带即为酶切后的目的条带(图2)。酶切产物连接、测序, 结果证实已成功构建了河南华溪蟹vasa原核表达载体pET32a-*Shvasa*。

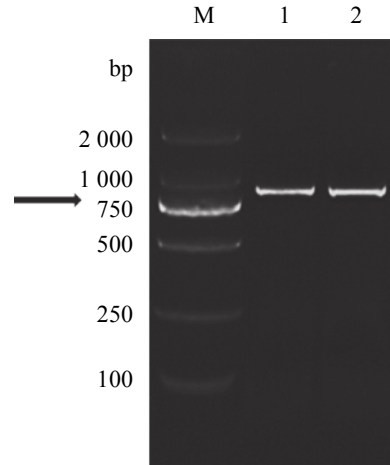


图1 *Shvasa*基因序列的PCR扩增产物

M. DNA Marker; 1. 卵巢cDNA为模板的扩增产物; 2. 精巢cDNA为模板的扩增产物; 箭头指示为*Shvasa*基因序列

Fig. 1 PCR amplification product of *Shvasa* gene sequence

M. DNA Marker; 1. PCR amplification product using cDNA of ovary as the template; 2. PCR amplification product using cDNA of testes as the template; arrow indicates the *Shvasa* gene sequence

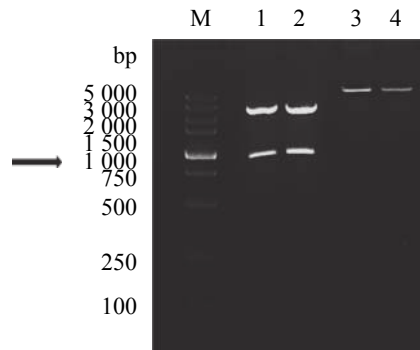


图2 载体双酶切电泳图

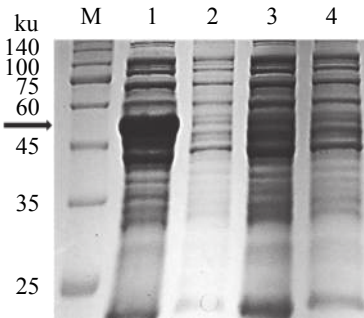
M. DNA Marker; 1~2. pMD19T-*Shvasa*重组载体的双酶切产物; 3~4. pET32a空载体的双酶切产物; 箭头指示为*Shvasa*的基因序列

Fig. 2 Electrophoregram of vectors digested by restriction endonuclease

M. DNA Marker; 1-2. the products of pMD19T-*Shvasa* digested by *EcoR* I and *Xho* I; 3-4. pET32a digested by *EcoR* I and *Xho* I; arrow indicates the gene sequence of *Shvasa*

### 2.2 VASA融合蛋白的表达与纯化

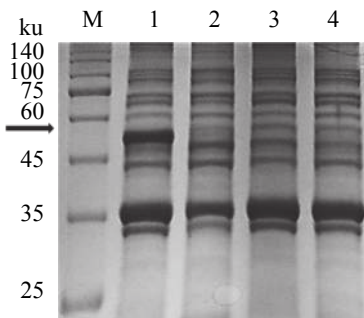
通过摸索不同的诱导条件, 成功诱导了VASA融合蛋白的表达。SDS-PAGE检测结果显示, 重组质粒工程菌经1 mmol/L IPTG诱导后, 在上清液和沉淀中分别检测到与预期大小一致的47 ku的目的条带, 即VASA融合蛋白(图3, 图4)。同时在重组质粒工程菌的上清液中, VASA融合蛋



**图3 SDS-PAGE检测上清液中VASA融合蛋白的表达**  
M. 蛋白Marker; 1. pET32a-*Shvasa*诱导后; 2. pET32a-*Shvasa*未诱导; 3. pET32a空载体诱导后; 4. pET32a空载体未诱导; 箭头指示为诱导表达的VASA融合蛋白

**Fig. 3 The detection of recombinant VASA protein in supernatant by SDS-PAGE**

M. protein Marker; 1. pET32a-*Shvasa* induced; 2. pET32a-*Shvasa* uninduced; 3. pET32a induced; 4. pET32a uninduced; arrow indicates the recombinant VASA protein



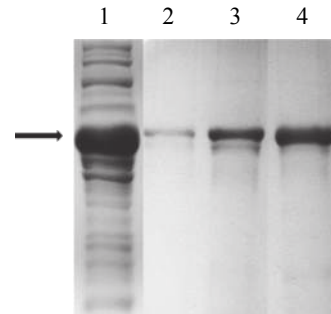
**图4 SDS-PAGE检测沉淀中VASA融合蛋白的表达**  
M. 蛋白Marker; 1. pET32a-*Shvasa*诱导后; 2. pET32a-*Shvasa*未诱导; 3. pET32a空载体诱导后; 4. pET32a空载体未诱导; 箭头指示为诱导表达的VASA融合蛋白

**Fig. 4 The detection of recombinant VASA protein in precipitation by SDS-PAGE**

M. protein Marker; 1. pET32a-*Shvasa* induced; 2. pET32a-*Shvasa* uninduced; 3. pET32a induced; 4. pET32a uninduced; arrow indicates the recombinant VASA protein

白大量表达(图3)。在对照实验中,未诱导的重组质粒工程菌及诱导前、后的转有空质粒的工程菌中,上清液和沉淀均未检测到相应大小的VASA融合蛋白条带(图3,图4)。因此可确定获得了可溶状态的VASA融合蛋白。进一步利用亲和纯化的方法,通过梯度咪唑浓度洗脱,对VASA融合蛋白进行了分离、纯化。结果显示,50 mmol/L咪唑浓度的洗脱液洗脱时,开始检测到目的蛋白(图5);随着咪唑浓度的增加,100和150 mmol/mL咪唑浓度的洗脱液洗脱时,目的蛋白的含量显著升高,150 mmol/mL咪唑浓度洗脱时,检测到

大量的目的蛋白。150 mmol/mL咪唑浓度洗脱时,获得了高浓度和高纯度的目的蛋白。电泳条带的灰度分析显示,150 mmol/mL咪唑浓度洗脱液洗脱收集的蛋白纯度在90%以上,达到了后续免疫实验的要求(图5)。



**图5 SDS-PAGE检测VASA融合蛋白的亲和纯化**

1. 未纯化的VASA融合蛋白; 2. 50 mmol/L咪唑浓度洗脱后的VASA融合蛋白; 3. 100 mmol/L咪唑浓度洗脱后的VASA融合蛋白; 4. 150 mmol/L咪唑浓度洗脱后的VASA融合蛋白; 箭头指示为VASA融合蛋白

**Fig. 5 The detection of purified recombinant VASA protein by SDS-PAGE**

1. unpurified recombinant VASA protein; 2. recombinant VASA protein eluted by 50 mmol/L imiuzole; 3. recombinant VASA protein eluted by 100 mmol/L imiuzole; 4. recombinant VASA protein eluted by 150 mmol/L imiuzole; arrow indicates the recombinant VASA protein

### 2.3 VASA蛋白多克隆抗体的制备与免疫鉴定

纯化后的VASA融合蛋白免疫新西兰大白兔,收集血清,制备了河南华溪蟹VASA蛋白的多克隆抗血清。通过ELISA方法测定所得抗体的免疫效价,结果显示抗体的效价高于 $1.0 \times 10^5$ ,符合后续实验要求。在此基础上,为鉴定所得抗血清的特异性,利用免疫吸附实验,并结合Western blot方法对抗体的特异性进行了检测。同时参照文献报道,*vasa*作为生殖标记分子,特异表达于性腺组织中<sup>[13-15]</sup>,因此选取卵巢进行抗体特异性检测,同时以鳃作为阴性对照分析抗体的特异性。结果显示,阳性抗血清作为一抗检测时在卵巢中检测到75 ku的特异条带,而在鳃中没有检测到相应的目的条带;此外,用不同兔子的免疫前血清(阴性对照血清)检测时,均未检测到相应的目的条带;特别是利用VASA融合蛋白吸附阳性抗血清后进行检测,同样未检测到相应的目的条带,表明本研究获得的河南华溪蟹VASA蛋白的多克隆抗体可特异性识别卵巢中75 ku的天然VASA蛋白(图6)。

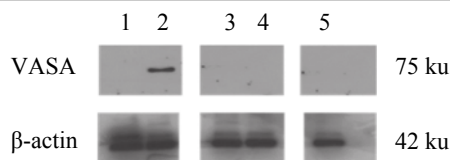


图6 Western blot检测ShVASA蛋白多克隆抗体的特异性

1. VASA阳性血清检测鳃组织; 2~5. VASA阳性血清(2)、免疫前血清(3~4)、免疫吸附后血清(5)分别检测卵巢组织

Fig. 6 Identification of the specificity of anti-VASA polyclonal antibody by Western blot

1. specificity detection of VASA protein in gills by anti-VASA serum; 2-5. specificity detection of VASA protein in ovary by anti-VASA serum(2), preimmune rabbit serum (3-4), and pre-adsorbed anti-VASA serum (5), respectively

### 3 讨论

构建合适的原核表达体系, 需要综合考虑诸多因素, 选择适当的宿主菌株、确定适宜的表达载体和诱导条件尤为重要。首先, 由于*Shvasa*表达序列中不含有大肠杆菌稀有密码子, 且不影响其在大肠杆菌中的正常表达<sup>[21]</sup>, 因此, 本研究选用BL21(DE3)蛋白酶缺陷型大肠杆菌作为宿主菌进行诱导表达。其次, 在表达载体的选择上, pET系统是在大肠杆菌中表达融合蛋白最强大的系统之一, 本实验选择了原核表达载体pET-32a, 该载体含有6×His标记, 重组蛋白可利用His标签进行亲和层析纯化蛋白。与GST标签蛋白相比较, His标签蛋白中只带有6个组蛋白, 使得目的蛋白的表达状态不会因为标签的引入受到影响, 更利于获得可溶状态的融合蛋白。再者, 由于IPTG可以通过激活T7 RNA聚合酶基因的启动子, 促使T7 RNA聚合酶的表达, 进而使载体上T7启动子下游插入的外源基因高效表达, 因此, 可以通过加入IPTG来调控外源蛋白的表达<sup>[21]</sup>。考虑到高浓度的IPTG可能对大肠杆菌生长造成影响, 本研究通过摸索IPTG的浓度与诱导时间对蛋白表达量的影响, 确定了最佳诱导条件: 菌体生长至OD<sub>600</sub>为0.67~0.70时, 加入1 mmol/L IPTG, 37 °C诱导4 h, 可获得大量可溶性VASA融合蛋白, 利于后续蛋白的分离与纯化。

不同物种中用于VASA蛋白原核表达的核苷酸序列长度与位置存在差异。在*Shvasa*蛋白多克隆抗体的制备过程中, 选定*Shvasa*基因N端的813 bp特异区段作为表达序列, 通过优化诱导条

件, 成功将VASA融合蛋白诱导表达于上清液中(图3, 图4)。与本研究相似, 在银鲫(*Carassius auratus gibelio*)中, 选取*vasa*基因的930 bp特异区段作为表达序列<sup>[6]</sup>, 诱导表达银鲫VASA融合蛋白于上清液中<sup>[6]</sup>。与之不同的是, 崔峥等<sup>[19]</sup>在日本沼虾中选取了*vasa*的完整开放阅读框(1 800 bp)作为表达序列, 通过优化IPTG浓度, 诱导表达日本沼虾VASA融合蛋白于包涵体中<sup>[19]</sup>。尽管不同物种中选取的序列不同, 但均获得了VASA融合蛋白, 不同的是融合蛋白的存在形式不同, 这可能与表达序列的长度和选取的位置有密切关系<sup>[6, 19, 22]</sup>。银鲫<sup>[6]</sup>与河南华溪蟹中用于表达的序列均为*vasa*基因的特异区段而非全长序列, 因此VASA融合蛋白的分子量较小, 使其可溶性增强, 易于在上清液中存在。而在日本沼虾的VASA与中华绒螯蟹的DMRT-like中, 用于表达的序列是整个编码序列, 因此融合蛋白分子量较大, 导致融合蛋白主要以包涵体的形式存在<sup>[19, 22]</sup>。

利用原核表达的蛋白作为抗原制备的多克隆抗体, 其特异性检测尤为重要。大多数抗体特异性检测实验仅采用免疫前血清作为阴性对照<sup>[23-24]</sup>, 通过阳性抗血清和免疫前的阴性血清分别检测融合蛋白和组织中的天然蛋白, 确定所得抗体的特异性<sup>[24]</sup>。但是为了进一步确保抗体的特异性, 一些研究中引入了免疫吸附实验<sup>[24]</sup>, 利用原核表达的蛋白与阳性血清进行孵育, 将阳性血清中特异识别该抗原的免疫球蛋白进行吸附, 进而达到去除的目的, 用此吸附后的血清作为阴性对照, 使特异性检测的证明更具有说服力。鉴于此, 为确定ShVASA抗体的特异性, 本研究通过免疫吸附实验, 证实了此次获得的ShVASA抗体能够特异性识别VASA融合蛋白和天然VASA蛋白, 具有特异性强、灵敏度高的特性。

作为生殖细胞的标记分子, 在诸多物种中*vasa*被用来追踪早期生殖细胞的形成、分化和迁移; 作为关键的母源因子, 在卵子发生和早期胚胎发育过程中*vasa*均发挥重要的调控作用<sup>[2-12, 25-26]</sup>。因此, 在生殖和发育生物学中, *vasa*成为研究动物体生殖调控机制的重要切入点。已有研究表明, 甲壳动物*vasa*基因在生殖细胞中特异性表达, 并且随着生殖细胞的生长、发育呈动态分布<sup>[13-20]</sup>。与之相似, 本研究在ShVASA蛋白多克隆抗体的鉴定中表明, ShVASA蛋白在

卵巢组织中特异性表达(图6),此外在后续研究中,通过ShVASA蛋白的组织特异性检测,已证明了ShVASA蛋白特异性表达于性腺组织中,预示着ShVASA蛋白在生殖细胞的发育、成熟过程中发挥着重要的调控作用。

#### 4 结论

本研究首次获得了河南华溪蟹VASA蛋白特异的多克隆抗体,为河南华溪蟹及其他蟹类VASA蛋白生物学功能的研究和生殖细胞的鉴定提供了有效手段,为探讨河南华溪蟹卵子发生的调控机制提供了分子基础。

#### 参考文献:

- [1] Dehghani M, Lasko P. C-terminal residues specific to Vasa among DEAD-box helicases are required for its functions in piRNA biogenesis and embryonic patterning[J]. *Development Genes and Evolution*, 2016, 226(6): 401-412.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Hartung O, Forbes M M, Marlow F L. Zebrafish *vasa* is required for germ-cell differentiation and maintenance[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2014, 81(10): 946-961.
- [8] Dehghani M, Lasko P. *In vivo* mapping of the functional regions of the DEAD-box helicase Vasa[J]. *Biology Open*, 2015, 4(4): 450-462.
- [9] Reunov A A, Reunova Y A. In mouse oocytes the mitochondrion-originated germinal body-like structures accumulate mouse Vasa homologue (MVH) protein[J]. *Zygote*, 2015, 23(4): 501-506.
- [10] Castrillon D H, Quade B J, Wang T Y, *et al.* The human *VASA* gene is specifically expressed in the germ cell lineage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17): 9585-9590.
- [11] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. Localization of *vasa*, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity[J]. *Development*, 1990, 109(2): 425-433.
- [12] Tanaka S S, Toyooka Y, Akasu R, *et al.* The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(7): 841-853.
- [13] Wang Q, Fang D A, Sun J L, *et al.* Characterization of the *vasa* gene in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: a germ line molecular marker[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2012, 58(7): 960-965.
- [14] Wang Y L, Chen Y D, Han K H, *et al.* A *vasa* gene from green mud crab *Scylla paramamosain* and its expression during gonadal development and gametogenesis[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4327-4335.
- [15] 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-PL10a*, in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(1): 37-45.
- [16] Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 669-678.
- [17] Nakkrasae L I, Damrongphol P. A *vasa*-like gene in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2010, 74(7): 835-842.
- [18] 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]. *Molecular Reproduction and Development*, 2007,

- 74(2): 172-177.
- [19] 崔峥, 朱小玲, 邱高峰. 日本沼虾VASA蛋白的原核表达、抗体制备及其免疫鉴定[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1495-1501.
- Cui Z, Zhu X L, Qiu G F. Prokaryotic expression, antibody preparation and immunological characterization of VASA protein in the prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(10): 1495-1501(in Chinese).
- [20] 李怡婷. 河南华溪蟹生殖调控基因 $vasa$ 的克隆和原核表达[D]. 太原: 山西大学, 2016.
- Li Y T. Cloning and prokaryotic expression of  $vasa$  gene from the freshwater crab *Sinopotamon henanense*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016 (in Chinese).
- [21] 张辉, 潘鲁青, 岳峰. 三疣梭子蟹C-型溶菌酶基因的原核表达与活性检测[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(7): 23-27.
- Zhang H, Pan L Q, Yue F. Expression of *Portunus trituberculatus* lysozyme gene in *E. coli* and evaluation of its lytic activity[J]. Periodical of Ocean University of China, 2013, 43(7): 23-27(in Chinese).
- [22] 邱高峰, 陈洁. 中华绒螯蟹精巢特异表达蛋白DMRT-like: 抗体制备及免疫鉴定[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 63-69.
- Qiu G F, Chen J. The testis-specific protein DMRT-like of the Chinese mitten crab: antibody preparation and immunological identification[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 63-69(in Chinese).
- [23] 王立正, 王子璇, 朱瑞, 等. 多巴胺能神经营养因子真核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(9): 1221-1224.
- Wang L Z, Wang Z X, Zhu R, et al. Expression and purification of CDNF and preparation of its polyclonal antibodies[J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(9): 1221-1224(in Chinese).
- [24] Sun M, Li Z, Gui J F. Dynamic distribution of *spindlin* in nucleoli, nucleoplasm and spindle from primary oocytes to mature eggs and its critical function for oocyte-to-embryo transition in *gibel carp*[J]. Ecological and Integrative Physiology, 2010, 313A(8): 461-473.
- [25] Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, et al. Zebrafish  $vasa$  RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification[J]. Journal of Cell Biology, 2000, 149(4): 875-888.
- [26] Qiu G F, Chen Y, Cui Z, et al. Localization of germline marker  $vasa$  homolog RNA to a single blastomere at early cleavage stages in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: evidence for germ cell specification by preformation[J]. Gene, 2013, 513(1): 53-62.

## Prokaryotic expression, antibody preparation and immunological identification of VASA protein in the freshwater crab (*Sinopotamon henanense*)

DU Xiaolin, WANG Lan\*, SUN Min\*

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** In order to study the expression pattern and function of the reproductive regulatory molecular VASA during gonadal development of the freshwater crab, *Sinopotamon henanense*(ShVASA), we have cloned the partial sequence of *vasa* gene in the freshwater crab, *S. henanense* (*Shvasa*). Based on the sequence, in the present study, we prepared the specific anti-VASA polyclonal antibody for exploring the expression pattern and function of ShVASA protein during gonadal development. A specific segment of 813 bp of *Shvasa* gene was selected and cloned into pET32a vector to construct the prokaryotic expression vector pET32a-*Shvasa*. After the recombinant vector was transferred into *Escherichia coli*, the recombinant VASA protein was expressed under the induction of IPTG. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein, which was about 47 ku, mainly existed in the supernatant. Using the fusion protein purified by Ni-NTA His-Bind affinity chromatography column as antigen, we immunized the New Zealand white rabbits, and obtained the polyclonal antibody of ShVASA protein. The titer of anti-VASA polyclonal antibody reached  $1 \times 10^5$  in ELISA assay. Furthermore, we identified the specificity of the antibody gained in this study. Immuno-adsorption and Western blot analysis indicated that the produced anti-VASA polyclonal antibody could specifically bind to the fusion protein as well as the natural ShVASA protein extracted from ovary. These results will provide a powerful tool for identification of germ cells in *S. henanense* and other crabs, and for the study on the function of VASA protein in decapoda.

**Key words:** *Sinopotamon henanense*; VASA protein; prokaryotic expression; antibody preparation; immunological identification

**Corresponding author:** WANG Lan. E-mail: lanwang@sxu.edu.cn; SUN Min. E-mail: sunm1112@163.com

**Funding projects:** Doctor Subject Foundation of the Ministry of Education of China (20131401120009)