

# 凡纳滨对虾溶菌酶基因在大肠杆菌中的表达和活性检测

张海波<sup>1</sup>, 谭洪新<sup>1</sup>, 王兴强<sup>2</sup>, 吴嘉敏<sup>1</sup>, 秦松<sup>3</sup>, 陈华新<sup>3</sup>, 阎斌伦<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 200090; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 将凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血淋巴细胞中提取的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增溶菌酶基因 (*LvLys* 基因) 的开放阅读框, 将其克隆至 pMD18-T 并测序。用限制性内切酶 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切取目的基因并与表达载体 pET-28a(+) 连接, 构建重组质粒 pET-28(a+)/*LvLys*, 转移到 BL21(DE3) 中诱导表达。经亲和纯化得到凡纳滨对虾重组溶菌酶。抑菌活性检测表明重组溶菌酶对大肠杆菌 TOP10 有一定抑制作用。

**关键词:** 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*); 溶菌酶基因; 原核表达; 溶菌活性

中图分类号: S942.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2009) 01-0048-06

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是中国主要的对虾养殖品种之一。自 20 世纪 90 年代以来, 由于对虾病的大规模暴发, 使中国的对虾养殖业蒙受了巨大损失。深入研究对虾自身免疫因子的抑菌作用是从源头上解决虾病对养殖业的威胁一个重要手段。对虾溶菌酶作为生物体内的非特异性免疫因子之一, 在引发和维持机体防御免疫过程中起着重要作用<sup>[1, 2]</sup>。Rojtinnakorn 等<sup>[3]</sup>研究发现, 溶菌酶在抑制白斑综合征病毒过程中起到了重要的抗菌作用。Hikima 等<sup>[4]</sup>在昆虫细胞中表达了日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的溶菌酶基因, 发现其产物对对虾的致病菌有抑制作用; 郑清梅等<sup>[5, 6]</sup>扩增斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 溶菌酶基因, 构建斑节对虾溶菌酶表达载体 pBV220-lyz, 经诱导表达后的溶菌酶对革兰氏阳性菌具有明显的抑菌作用。此外, 高凤英等<sup>[7]</sup>以 PCR 法制备罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 溶菌酶基因的生物素标记探针, 对感染弧菌后的溶菌酶 mRNA 的转录水平进行了观察, 结果表明溶菌酶基因在非特异性免疫中具有直接的作用。为了进一步研究凡纳滨对虾溶菌酶基因的功能, 并为制备特异性抗体做准备, 本研究克隆了凡纳滨对虾溶菌酶基因, 构建了 pET-28(a+)/*LvLys* 融合表达载体, 在大肠杆菌中进行

了表达, 并检测了抑菌活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试虾、质粒和菌种

凡纳滨对虾购于青岛市崂山区东海湾对虾养殖场, 个体大小为 10~12 cm, 体质量约为 13 g。pET-28a(+) 质粒、基因工程宿主菌 *E.coli* Top10 和表达菌 *E.coli* BL21 (DE3) 由中国科学院海洋研究所基因高效表达实验室秦松研究员保存。

### 1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶和缓冲液、dNTPs、T<sub>4</sub>DNA 连接酶及其缓冲液、DNA Marker、蛋白质 Marker、pMD18-T 载体、限制性内切酶 *BamH* I 和 *Hind* III, 均为 Takara 公司产品; 经典总 RNA 提取试剂盒和 MMLV Single Step RT-PCR Kit 试剂盒, 为上海生工生物有限公司产品; DNA 胶回收试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品; 亲和层析柱购自 Novagen 公司; 质粒提取试剂盒为北京博大泰克公

收稿日期: 2008-07-18; 修回日期: 2008-09-25

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2006548); 江苏省“青蓝工程”项目 (QN07008); 国家 863 计划项目 (2006AA100311)

作者简介: 张海波 (1982-), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事海水集约化养殖方向的研究, E-mail: hb-zhang@stmail.shou.edu.cn; 谭洪新, 通讯作者, 教授, 主要从事循环水工厂化养殖的研究, 电话: 021-65710018

司产品; 氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG购自Promega公司, 引物合成和测序由上海生工有限公司完成。

### 1.3 对虾抽血和RNA提取

参照文献[8]的配方配制对虾血细胞抗凝血剂, 从凡纳滨对虾腹窦处抽血, 收集血细胞。依照经典总RNA提取试剂盒的方法提取凡纳滨对虾血液RNA, 取适量RNA通过 1.7%琼脂糖凝胶电泳检测质量, 同时用Genquant Pro (核酸蛋白定量仪) 检测样品的 $A_{260/280}$ 值。

### 1.4 引物设计和RT-PCR

参考已报道的多种生物溶菌酶基因序列<sup>[9, 10]</sup>, 设计合成扩增引物, P1: GTGATAATACTTGGATCATAGAAATG; P2: CTAGAACGGGAAGACAGAGTTGG。依据MMLV Single Step RT-PCR Kit试剂盒的操作方法, 按照以下程序进行 RT-PCR: 合成cDNA第1链的反应条件为37℃ 30 min; 以P1和P2进行PCR扩增, 反应条件: 94℃预变性2 min, 然后进行40个循环: 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s。最后1个循环: 72℃, 7 min, 4℃保存。经1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

### 1.5 重组表达载体的构建及重组子的鉴定

目的片段经琼脂糖凝胶电泳回收, 与pMD18-T Vector 16℃连接过夜, 连接产物转化*E.coli* Top10感受态细胞, 铺于含氨苄(Amp)的LB平板中, 37℃培养过夜, 将经鉴定构建的阳性克隆pMD18-T/*LvLys*送上海生工测序。*Bam*H I、*Hind* III分别双酶切表达载体pET-28a(+)和重组阳性克隆载体pMD18-T/*LvLys*, 纯化回收目的片段, 然后在T<sub>4</sub> DNA连接酶的作用下16℃连接过夜, 转化用CaCl<sub>2</sub>法制备的*E.coli* BL21(DE3)感受态细胞, 涂布在含有卡那霉素(Kan)的LB平板上, 37℃过夜培养, 挑取单菌落接种于50 μg/mL Kan的LB液体培养基中, 37℃, 220 r/min下振荡培养8~12 h, 将阳性克隆pET-28a(+)/*LvLys*送上海生工测序。

### 1.6 重组*LvLys*基因在*E.coli* BL21中的表达

将阳性重组子的菌液按1%的接种量接入新鲜的含Kan的LB液体培养基中, 37℃下振荡培养至菌液 $A_{600}$ 值为0.6~0.8时, 加入终浓度为0.8 mol/L IPTG后, 将菌液放至37℃下振荡培养, 然后于诱导后0、2、4、6、8、10、12、14、16 h分别取样1 mL菌液, 12 000 r/min离心收集菌体, 按照分子克隆常规方法<sup>[11]</sup>进行SDS-PAGE电泳检测表达情况, 确定最佳诱导时间, 进行大规模诱导表达。

### 1.7 从包涵体中纯化重组*LvLys*蛋白

诱导表达过程结束后, 通过低温离心获得菌体, 在裂解液的稀释下进行超声破碎, 10 000 r/min离心30 min, 取1 mL上清液作为对照, 剩下的上清进行亲和层析, 通过15% SDS-PAGE检测纯化蛋白的状态, 然后通过电泳结果发现重组*LvLys*蛋白都是以包涵体形式存在, 按照包涵体的处理方法<sup>[12~15]</sup>, 将上步离心所得的沉淀用含尿素的结合缓冲液洗涤两遍后, 以50倍沉淀体积的结合缓冲液重悬。冰浴中以40 W功率超声波破碎细胞(每破碎8 s间隔2 s, 共60 min), 然后于4℃以10 000g离心30 min, 保留上清, 用Ni<sup>2+</sup>-NTA柱亲和层析, 所得变性的纯化重组蛋白参照kuhelj等<sup>[16]</sup>的基础上加入5%的甘油进行梯度透析(第一透析4 mol/L尿素, pH 8.0, 第二次和第三次透析的尿素浓度变为2 mol/L和0 mol/L), 最后再用去离子水透析过夜, 复性后样品经过离心冻干获得重组可溶性目的蛋白。

### 1.8 重组表达*LvLys*蛋白浓度测定和活性检测

*LvLys*蛋白浓度的测定用牛血清蛋白为对照, 依据Bradford<sup>[17]</sup>的方法进行。参考Nakamura等<sup>[18]</sup>、Casteel等<sup>[19]</sup>的液体生长抑制法检测*LvLys*蛋白活性, 于5 mL LB培养液中37℃活化*E.coli* TOP10菌种, 次日取10 μL过夜培养的菌液溶解到10 mL PB培养基(1%胰蛋白胍, 0.5% NaCl, pH 7.5)中。取9支试管, 每个试管中加入1 mL稀释过的*E.coli* TOP10菌液, 然后向试管中加入1 mL复性后的*LvLys*蛋白样品(蛋白含量1 μg/μL), 其余加入1 mL PB培养基和1 mL Amp(0.25 g/L)作为两个对照样, 设定3个平行实验, 25℃ 30 r/min摇动培养, 在 $A_{630}$ 下测定吸光度, 绘制吸光度与时间曲线。

## 2 结果

### 2.1 血细胞总RNA提取和PCR扩增溶菌酶基因

所提取的对虾血细胞总RNA经1.7%琼脂糖凝胶电泳检测有清晰明亮的条带(图1), 核酸蛋白定量仪检测样品的 $A_{260/280}$ 值为1.803。以总RNA为模板, RT-PCR扩增目的基因, 产物经1%电泳检测在约500 bp处有明亮的特异带(图2)。

### 2.2 重组质粒pET-28(a+)/*LvLys*的构建和鉴定

将回收的PCR产物克隆入pMD18-T载体, 转化*E.coli* Top10, 通过用上下游引物P1和P2进行PCR扩增, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测可见大小为

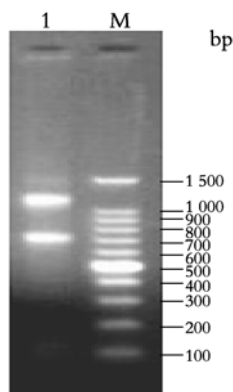


图 1 总 RNA 电泳图

Fig.1 The gel electrophoresis pattern of total RNA

1. 总 RNA; M. DNA 标准 DL 1500  
1. total RNA ; M. DL 1500 markers

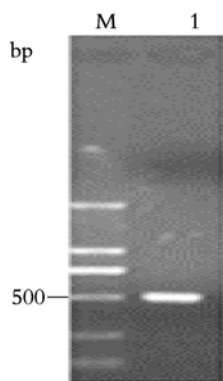


图 2 RT-PCR 产物电泳图

Fig.2 The gel electrophoresis of the RT-PCR products

1. RT-PCR 产物; M. DNA 标准 DL 2000  
1. RT-PCR products ; M. DL2000 markers

500 bp 的扩增产物与 *BamH* I、*Hind* III 双酶切的目的片段大小一致 (图 3), 测序结果经 Blast 比对与注册的 AF425673 *L.vannamei* 基因序列一致。

以 *BamH* I / *Hind* III 分别双酶切质粒 pET-28(a+) 和 pMD18-T/*LvLys*。胶回收两目的片段并连接过夜 (图 4), 转入宿主菌后, 通过用上下游引物 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可见大小为 500 bp 的扩增产物, 测序结果也证明已成功构建 pET-28(a+)/*LvLys* 重组表达质粒。

### 2.3 重组对虾溶菌酶 *LvLys* 在 *E.coli* BL21 中的表达

SDS-PAGE 检测重组对虾溶菌酶 *LvLys* 在诱导后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 h 的表达产物

(图 5), 结果显示在诱导后 10 h 后表达量达到最高, 之后保持相对平稳趋势, 因此确定了诱导表达的最佳时间。

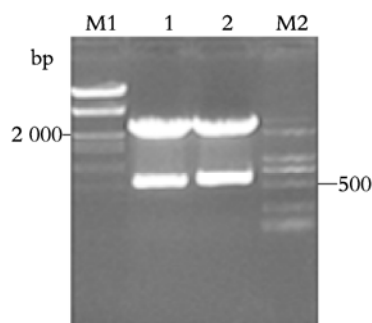


图 3 重组质粒 pMD18-T/*LvLys* 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction endonuclease pattern analysis of the recombinant plasmid pMD18-T/*LvLys*

M1.  $\lambda$ DNA/*EcoR* I + *Hind* III 标准 ; M2. DNA 标准 DL 2000 ;  
1,2. pMD18-T/*LvLys* 质粒的 *BamH* I / *Hind* III 双酶切产物

M1.  $\lambda$ DNA/ *EcoR* I + *Hind* III markers ; M2. DL2000 markers; 1,2. double-digested product of the recombinant plasmid pMD18-T/*LvLys*

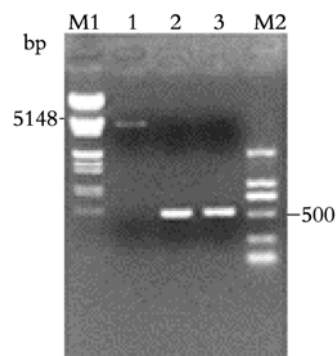


图 4 重组质粒胶回收电泳检测

Fig.4 Analysis of recombinant plasmid with the method of page reclamation

M1.  $\lambda$ DNA/ *EcoR* I + *Hind* III 标准 ; M2. DNA 标准 DL 2000 ; 1. 重组质粒 pET-28(a+) 胶回收产物; 2,3. 重组质粒 pMD18-T/*LvLys* 胶回收产物  
M1.  $\lambda$ DNA/ *EcoR* I + *Hind* III markers ; M2. DL2000 markers; 1. products of the recombinant plasmid pET-28(a+) with the method of page reclamation; 2,3. products of the recombinant plasmid pMD18-T/*LvLys* with the method of page reclamation

### 2.4 从包涵体中纯化重组 *LvLys* 蛋白

诱导表达菌液初步纯化后, 经过 15% SDS-PAGE 对其上清和纯化产物分析 (图 6), 菌液离心后的上清中未检测到蛋白的存在, 说明经过诱导表达的重组 *LvLys* 蛋白是以包涵体形式存在, 成为了不溶性沉淀。对包涵体变性、纯化和复性后得

到了可溶的目的蛋白（图7）。

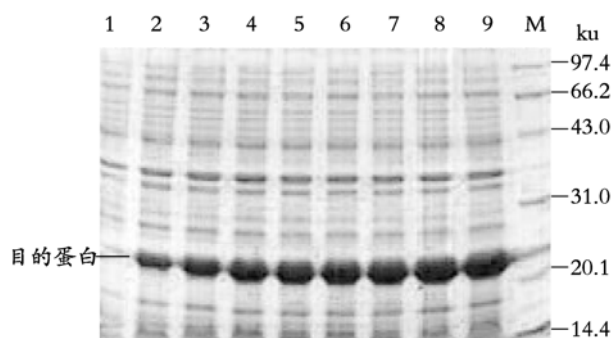


图5 15% SDS-PAGE 检测 *LvLys* 蛋白的表达

Fig.5 15% SDS-PAGE analysis of the expression of *LvLys* protein

M.低分子质量蛋白标准; 1,2,3,4,5,6,7,8,9 分别表示重组 *LvLys* 在 *E.coli* BL21 中诱导 0,2,4,6,8,10,12,14,16 h 后的表达产物

M. low molecular weight protein marker; 1,2,3,4,5,6,7,8,9,the expression product 0,2,4,6,8,10,12,14,16 h after induction, respectively.

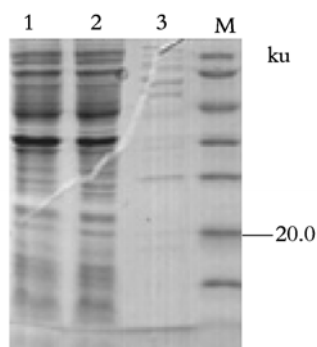


图6 15% SDS-PAGE 检测初步纯化的表达产物

Fig.6 15% SDS-PAGE analysis of the purified expression product

M. 低分子质量蛋白标准; 1. 上清样品; 2. 穿透峰样品; 3.洗脱峰样品

M.low molecular weight protein marker; 1.supernatant liquor; 2.flow-through; 3.the protein washed from the column with elution buffer

### 2.5 重组表达 *LvLys* 蛋白浓度测定和活性检测

依据 Bradford 方法检测复性后的 *LvLys* 蛋白的浓度为 0.5 mg/mL, 通过液体生长抑制法测定吸光度 ( $A_{630}$ ), 绘制吸光度与时间的曲线 (图 8)。由图 8 可见, 复性后的融合蛋白对大肠杆菌 TOP10 有一定的抑菌活性。

### 3 讨论

溶菌酶作为对虾非特异性免疫因子, 参与机体

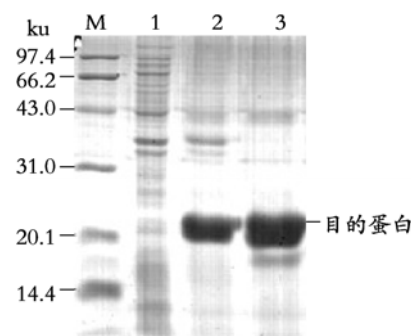


图7 15% SDS-PAGE 检测对包涵体复性后的产物

Fig.7 15% SDS-PAGE analysis of the renatured inclusion bodies

M.低分子质量蛋白标准; 1.次纯化前上清; 2.素洗涤包涵体后上清; 3.化后的透析液

M.low molecular weight protein marker; 1.supernatant liquor purified firstly; 2.supernatant liquor of the renatured inclusion bodies; 3.the purified dialysis solution

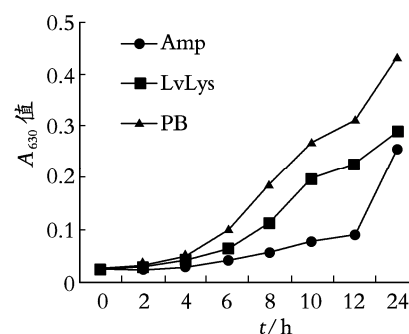


图8 液体生长抑制法检测 *LvLys* 蛋白抗大肠杆菌 TOP10 活性

Fig.8 Dectecion of antibacterial activity of *LvLys* by liquid growth inhibition against *E.coli* TOP10

多种免疫反应, 能改善和增强巨噬细胞吞噬能力和消化功能, 从一定程度上提高对虾的生长率和成活率, 这为解决对虾养殖过程中遇到的疾病难题提供了切实有效的帮助。作者采用大肠杆菌表达外源蛋白的方法, 进行了凡纳滨对虾溶菌酶基因的原核表达研究, 获得了目的蛋白且检测到活性的存在。大肠杆菌表达系统作为原核表达系统, 对于来自真核生物的溶菌酶基因, 其表达水平受到一定的限制。首先, 重组溶菌酶作为一种免疫蛋白, 在大肠杆菌

中表达的同时对表达菌株产生了一定抑菌作用,对于目的蛋白的稳定表达造成了一定影响;其次,由于经过诱导表达后的蛋白主要以不溶的包涵体形式存在,经过变性和复性处理后的蛋白量较低且活性检测效果较差,这是获得优质凡纳滨对虾溶菌酶的瓶颈,需要继续完善复性条件,克服这一难题。第三,采用的表达载体是带有His-tag的pET-28(a+)载体,通过诱导表达后的蛋白通过Ni<sup>2+</sup>-NTA柱进行亲和层析,所纯化出的重组溶菌酶在梯度透析除尿后,得到可溶性重组溶菌酶,在SDS-PAGE检测重组表达蛋白时,发现重组蛋白分子质量大于理论值,有文献报道,一些含有His-tag的融合蛋白在SDS-PAGE检测时其分子质量大于理论值<sup>[20, 21]</sup>,根据生物学软件计算,目的蛋白相对分子质量约为16 ku,载体上融合表达的His-Tag标签等序列的相对分子质量5 ku左右,因此,重组蛋白的相对分子质量应为21 ku左右,实验结果与此相吻合。此外,从重组对虾溶菌酶的活性检测来看,对革兰氏阴性菌它也具有一定的抑菌作用,但相比卜兴江等<sup>[22]</sup>、Tyagi等<sup>[23]</sup>研究结果发现,凡纳滨对虾对革兰氏阳性菌则具有明显的抑菌效果。人们通常是将重组溶菌酶与甘氨酸、植酸、聚合磷酸盐等物质配合使用,以增强对革兰氏阴性菌的溶菌作用。

**致谢:** 本实验完成过程中得到了中国海洋大学关翔宇博士的大力帮助,谨致谢意!

#### 参考文献:

- [1] Won J L, Paul T B. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori*[J]. **Gene**, 1995, **161** (2): 199-203.
- [2] Soushi F, Izumi T T, Keiko K, *et al.* Protein purification cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*[J]. **Comp Biochem Physiol**, 2001, **128** (4): 709-718.
- [3] Rojtinnakorn J, Hiruno I, Itami T, *et al.* Gene expression in haemocytes of Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach[J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2002, **13** (1): 69-83.
- [4] Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, *et al.* Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species[J]. **Gene**, 2003, **316**: 187-195.
- [5] 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因克隆及序列分析[J]. *水生生物学报*, 2004, **28**(4): 413-417.
- [6] 郑清梅, 叶星, 白俊杰, 等. 斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测[J]. *水产学报*, 2005, **29** (1): 20-24.
- [7] 高风英, 叶星, 白俊杰, 等. 两种沼虾溶菌酶基因 ORF 的克隆和罗氏沼虾溶菌酶基因的组织表达[J]. *水生生物学报*, 2005, **29** (6): 615-620.
- [8] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*[J]. **Dev Comp Immunol**, 2001, **25** (7): 565-577.
- [9] Sotelo-Mundo R R, Islas-Osuna M A, de-la-Re-Vega E, *et al.* cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*[J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2003, **15**: 325-331.
- [10] de-la-Re-Vega E, Garcia-Galaz A, Diaz-Cinco M E, *et al.* White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*[J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2006, **20** (3): 405-408.
- [11] 金冬雁, 黎孟枫译. J.萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南第二版[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 880-887.
- [12] Khan R H, Rao K B, Eshwari A N, *et al.* Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *E.coli*[J]. **Biotechnol Prog**, 1998, **14** (5): 722-728.
- [13] Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R, *et al.* Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2000, **18** (2): 182-192.
- [14] Sunitha K, Chung B H, Jang K H, *et al.* Refolding and purification of zymomonas mobilis levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2000, **18** (3): 338-393.
- [15] Kiefer H, Maier K, Vogel R. Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*[J]. **Biochem Soc Trans**, 1999, **27** (6):

- 908-912.
- [16] Kuhelj R, Dolinar M, Pungercar J, *et al.* The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies[J]. *Eur J Biochem*, 1995, **229** (2): 533-539.
- [17] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [18] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, *et al.* Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure[J]. *J Biol Chem*, 1988, **263** (32): 16 709-16 713.
- [19] Casteels P, Ampe C, Jacobs F, *et al.* Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees[J]. *EMBO J*, 1989, **8** (8): 2 387-2 391.
- [20] 唐威华, 仇子龙, 王宗阳, 等. 水稻 cDNAc73 片段在大肠杆菌中的表达及其产物的纯化[J]. 植物生理学报, 1999, **25** (4): 401-407.
- [21] Niu X, Guiltinan M J. DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (23): 4 969-4 978.
- [22] 卜兴江, 杜欣军, 周文杰, 等. 中国明对虾溶菌酶基因克隆、重组表达与性质分析[J]. 生物工程学报, 2008, **24** (5): 723-732.
- [23] Tyagi A, Khushiramani R, Karunasagar I, *et al.* Antiviral activity of recombinant lysozyme expressed from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2007, **272**: 246-253.
- [19] Casteels P, Ampe C, Jacobs F, *et al.* Apidaecins:

## Expression of *Litopenaeus vannamei* lysozyme gene in *Escherichia coli* and evaluation of its lytic activity

ZHANG Hai-bo<sup>1</sup>, TAN Hong-xin<sup>1</sup>, WANG Xing-qiang<sup>2</sup>, WU Jia-min<sup>1</sup>,  
QIN Song<sup>3</sup>, CHEN Hua-xin<sup>3</sup>, YAN Bin-lun<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China; 2. Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangshu, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China ; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** Jul., 18, 2008

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; lysozyme gene; prokaryocyte expression; lytic activities

**Abstract:** The total RNA extracted from the hemocyte sample of *Litopenaeus vannamei* (*L. Vannamei*) was used to amplify the sequence encoding an open reading frame for lysozyme gene (called *LvLys* gene) by RT-PCR. The sequence was then cloned into pMD18-T vector and was sequenced. The recombinant plasmid was sequenced and digested by *BamH* I and *Hind* III. The target gene was subsequently connected to the pET-28a (+) vector, which was digested with the corresponding restriction endonuclease. The recombinant plasmid pET-28a(+)/*LvLys* was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and then induced by isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) and purified through chelating affinity, finally recombinant *LvLys* protein was analyzed and lytic activity was assayed. The recombinant protein showed a certain antibacterial activity against *Escherichia* TOP10.

(本文编辑: 康亦兼)