

重组甲鱼载脂蛋白 B 的研制及其阻断 STSSSV 感染的活性初探

许丽华, 顾叶华, 陈梅娟, 李登峰*

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832)

摘要: 为了制备甲鱼(*Pelodiscus sinensis*)载脂蛋白 B (*Pelodiscus sinensis* Apolipoprotein B, PApoB)基因的原核表达产物, 并探索其是否具有阻断甲鱼系统性败血症球状病毒(Soft-shelled Turtle Systemic Septicemia Spherical Virus, STSSSV)感染的功能, 为最终控制和防治甲鱼系统性败血症疾病奠定基础, 构建了PApoB的原核表达系统, 纯化了重组PApoB, 并将其用于阻断STSSSV感染的分析: 根据甲鱼PApoB的基因序列, 设计引物, 扩增其第9932-11209bp(3294-3696 aa)区段, 将其连接至表达载体pET-28a(+)中, 转化大肠杆菌Rosetta株, 经硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 并用亲和层析法纯化获得了重组PApoB; 将FITC标记的STSSSV与PApoB孵育后对甲鱼细胞进行攻毒, 显微镜下PApoB添加组的病毒荧光信号明显低于非添加组, 表明该重组蛋白可以阻断STSSSV的感染。

关键词: 甲鱼; 载脂蛋白 B; STSSSV; 原核表达; 感染阻断

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2020) 02-0007-06

甲鱼(*Pelodiscus sinensis*)作为一种名贵的水产品, 是我国中南部地区宴席上不可或缺的佳肴。随着人工养殖规模不断扩大, 集约化程度不断提高, 各种病害也相继出现。与其他水产养殖物种相同, 病毒性病害已经成为限制甲鱼养殖可持续发展的一个重要因素。2007年以来, 浙江各甲鱼养殖场频繁爆发一种系统性败血症, 该病害传染性极高, 一周内累积死亡率可达90%~100%, 给甲鱼养殖户带来了巨大的经济损失。研究发现甲鱼系统性败血症球状病毒(STSSSV)是该病害的原发性病原, 能够引起甲鱼全身性败血、坏血, 最终导致甲鱼大规模死亡^[1-3]。本研究组^[4]最近的研究发现甲鱼细胞的载脂蛋白 B (PApoB)能够和STSSSV结合, 可能参与STSSSV感染宿主细胞的过程。本文以此为靶标, 制备可溶态载脂蛋白 B, 用其通过竞争法阻断STSSSV感染甲鱼细胞, 为进一步的抗病毒药物研发打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

载体质粒pET-28a(+), 克隆菌 *Escherichia coli* DH5a、表达菌 *E. coli* Rosetta(本实验室保存); 总RNA提取试剂、第一链cDNA合成试剂盒、Ex Taq酶、限制性内切酶、T4连接酶(TaKaRa公司); DNA胶回收试剂盒和质粒DNA小量纯化试剂盒(艾德莱); His Gravitrap亲和层析柱(GE Healthcare); PVDF膜(Millipore); 鼠ApoB IgG (Abcam); HRP-兔抗鼠IgG(索莱宝); PCR引物合成、测序由杭州擎科生物技术有限公司完成; 其他试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 引物

根据PApoB基因序列, 设计扩增其第9932~11209 bp (3294~3696 aa)的引物, 引物F: 5'-CGC

收稿日期: 2019-01-23.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903000); 浙江省公益性技术应用研究计划(2011C32004); 宁波市农业攻关项目(2011C10004)。

第一作者: 许丽华(1995-), 女, 安徽铜陵人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: 1136912634@qq.com

*通信作者: 李登峰(1975-), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

GGATCCCGCACACTGAACTTCCTAAG-3', 下划线为 BamHI 酶切位点; 引物 R: 5'-CCCAAGCTTCATCTCAGGAATTGTGATTGT-3', 下划线为 HindIII 酶切位点.

1.2.2 总 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

总 RNA 的提取根据 TaKaRa RNAiso plus 总 RNA 提取试剂盒的说明书, 由甲鱼肝脏提取. 第一链 cDNA 的合成根据 TaKaRa PrimerScript II 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书进行.

1.2.3 PCR 扩增目的基因及其亚克隆

PCR 反应体系: 10×Ex Taq buffer 2.5 μL , 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL , 1.2.2 制备的模板 1 μL , Ex Taq 酶 0.6 U, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物 F、R 各 1 μL , dH_2O 补足 25 μL . 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 56 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

用胶回收试剂盒由琼脂糖凝胶中回收目的片段与 pMD-18-T 载体在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接 4 h, 将连接产物转化 DH5 α 感受态, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取单菌落经上述反应条件进行菌落 PCR 鉴定, 取阳性菌落接种到含氨苄青霉素(Amp)的 LB 中进行培养, 并提取质粒 pMD-18T-PapoB.

1.2.4 pET-28a-PapoB 重组质粒的构建

分别用 BamHI/HindIII 双酶切 pMD-18T-PapoB 和 pET-28a 载体, 割胶回收目的 DNA 片段, 用 T4 DNA 连接酶将其连接组成重组载体 pET-28a-PapoB, 将其转化 DH5 α , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取单菌落用上述反应条件进行菌落 PCR 鉴定, 取阳性菌落接种于含有卡那霉素(Kana)的 LB 中培养, 并提取质粒. 对质粒中的插入片段进行序列测定, 确认其正确性.

1.2.5 PApoB 蛋白的表达、纯化及复性

将重组质粒 pET-28a-PapoB 转化 Rosetta 株, 于含有卡那霉素和氯霉素的平板上培养过夜, 挑选单菌落置于含有卡那霉素(终质量浓度 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和氯霉素(终质量浓度 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡培养; OD 值达 0.60~0.65 时, 分别加入 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代半乳糖苷(IPTG), 继续培养 3 h, 取 250 μL 各诱导物, 离心, 菌沉淀用 PBS 悬浮并经超声波破碎后离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 确定合

适的 IPTG 浓度和产物是否可溶后进行大量诱导表达.

诱导产物经超声破碎后收集沉淀, 用包涵体洗涤缓冲液洗涤(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脲)3 次后按照 His Gravitrap 亲和柱说明书的包涵体纯化方案进行蛋白纯化, 纯化产物装入透析袋置于尿素浓度递减的复性液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 体积分数 5% 的甘油, 体积分数 0.5% 的吐温-20, 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘氨酸, 还原型谷胱甘肽 0.614 g, 氧化型谷胱甘肽 0.0122 g)中缓慢透析复性, 最后透析于磷酸盐缓冲液(PBS)中. 对产物进行 SDS-PAGE 电泳及 western blotting (WB)鉴定, 其中 WB 所用一抗为鼠 ApoB IgG, 二抗为 HRP-兔抗鼠 IgG.

1.2.6 病毒纯化和 FITC 标记

病毒 STSSSV 纯化参照 Zhang 等^[3]方法. 将完整 STSSSV 病毒粒子标记 FITC 后用于细胞学水平的人工感染阻断实验, 参照 Fang 等^[5]标记方法. 按质量比 1:100 将 STSSSV 与 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FITC 混合, 室温轻摇, 孵育 1 h 后 20 000 g 离心 20 min, 弃上清, 将沉淀轻柔地用 PBS 缓冲液悬浮, 再次离心, 如此重复洗 3 次, 去除未结合的 FITC, 最后用 1 mL PBS 缓冲液悬浮沉淀, 避光备用.

1.2.7 体外感染阻断试验

剪开甲鱼胸甲, 剪断动脉放血, 用装有适量抗凝剂(0.05% 柠檬酸、0.8% 柠檬酸钠、0.42% 氯化钠和 1.87% 葡萄糖)的烧杯收集血液. 将标记了 FITC 的 STSSSV (STSSSV-FITC)、重组 PApoB 与血细胞于冰上共孵育 2 h 作为实验组; STSSSV-FITC、PBS 与血细胞共孵育作为对照组; PBS 与血细胞孵育作为空白组. 各组经 700 g 离心 2 min, 沉淀用 0.65% 的生理盐水(Stroke-Physiological Saline Solution, SPSS)悬浮, 再离心, 如此洗涤 3 次, 吸取血细胞, 用拉片法制作血推片, 干燥后用福尔马林固定, 并用 DAPI 给细胞核染色(蓝色), 荧光显微镜下观察拍照.

取甲鱼肝脏, 在载玻片上制作肝脏印片, 分别滴加等体积 STSSSV-FITC 与重组 PApoB 的混合液(实验组), STSSSV-FITC 与 PBS 的混合液(对照组)和 PBS(空白组), 孵育 30 min 后, 用生理盐水冲洗印片, 用 DAPI 给细胞核染色, 荧光显微镜下观察拍照.

2 结果

2.1 目标基因片段的扩增和重组载体的构建

琼脂糖凝胶电泳显示肝脏组织总 RNA 提取成功(图 1(a)), RT-PCR 产物大小为 1296 bp(图 1(b)), 符合引物设计. 序列测定表明重组质粒 pET-28a-PApoB 中正确地插入了目的基因片段, 序列如下:

5'-CGCGGATCCCGCACACTGAAACTTCCT
AAGTTCACAGTGCACCCATCAACCCATATCTT
GATTCCTGCTTTGGGAAACATTACCTATGACTT
TTCATTTAAATCCAGCATGATTACCTTGAATAC
AAATATTGGACTTTTCAACCAGTCTGACATTAT
TGCTCGCTTCAGTTCCTCATCTTCTTCTGTCTAT
TGATGCAGTGCAGTTCAATTTAGATGGTACCA
CAAGCCTGACAAGGAAAAGGGGTTTGAAACT
GGCCACAGCATTATCCCTGAGTAATAATAAATT
TGTGGAAGGAAAGCATGAAAGCACTGTTAGT
CUAACAAGAGGAACAUAGAAGCCTCAGTGA
CAACAAATGCAAAGATCAACTTGCCAGTTTTT
AAAATGAATTTCAATCAGGAACCTTAAAGGAA
ACACTAAATCCAAGACTACTGTTTCCTCAGCA
ATTAATTTAAATTATGACTTTGATACTCTTAAAT
ATGGAGCCAGTGCTAAAGGTGCAGTTGATCAC
AACTTACTCTTGAAAGTCTTACATCTTCGATT
TCTGTAGAGACATCAACAAAAGGCAGCATTA
TGGAATGCUATACACCCAAAATCCATTTTCTG
GAATGCUATCCATGAGGCAAATACCTATTTG
AACTCTAAGGGAGCTCGCTCTTCAGTCAAGCT
GGAGGGTAAGTCTAAAGCAGATGGAATCTGG
AATGTGGACGTGGCAGAAAAAAGCTTGCCGTTG
AAGCATCTACGCAACGTGTTTATGCAATCTGG
GAGCACAATGGGGAAGAACTATGGACAATTTAC
CCCTCTTTTGAGAACTAAAGGGACTCAGAACT
GCAGAGTAACCTTAGAGCTGGTTCCTTGGAGT
ATGTCAGCAGCTCTTCAGAUACAAGCTACTCA
ACCAAATTTCTTCTTGAGACAUAGCTTCAGTTA
ATCAAGTAGTCTTATTGAACATCAACACTGAA
AACCAGAACTTGGTTGGAAGGGTGAAGGCC
AGATTCAGTCATTATCTCTCAGTCATGATATGC
AGTTATCAAATGAAAAACAAAGGTGCAATTT
GACATTTCTGGGTCTTTGGAAGGACATATTGAT

TTCCTCAAGAACTTTGTGTGTCCAGTGTATGA
AAAGAGTTTATGGGATATCTTGAAACTGGATC
TCACTACCAGTGCTGACAGGAAGCAATATTTA
AATACTTCTGCCTCCAUAGTTTGTACAAAAAG
TGAAGATGGTTACTTTTTCCCTTTATATGTGAA
TAGACTGGCTGATGGCTTCACAATCACAATTC
CTGAGATGAAGCTTGGG-3'(下划线部分为稀有
密码子).

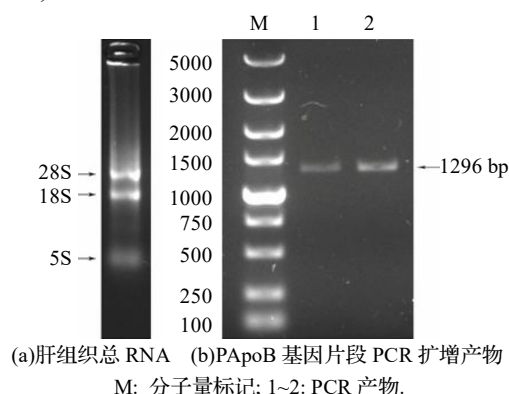
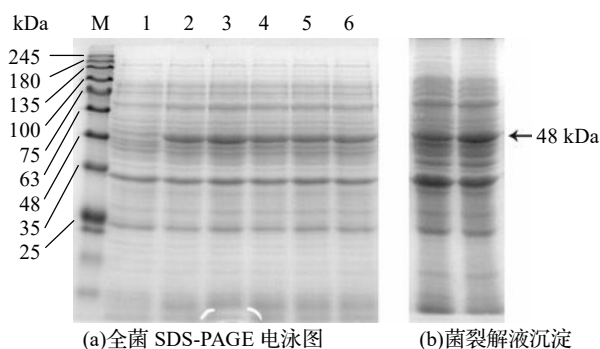


图1 核酸琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 pET-28a-PApoB 在大肠杆菌中的表达

由于目的基因含有诸多稀有密码子, 选取 Rosetta 株作为表达菌. pET-28a-PApoB 重组质粒转化 Rosetta 后, 经 IPTG 小量诱导表达, IPTG 的浓度分别为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹. SDS-PAGE 表明, 经 IPTG 诱导的样品中均有一条分子量大约 48 kDa 的较粗条带(图 2(a)), 其大小与其基因片段的大小相对应. 其中 0.4 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导的目的蛋白表达量最大, 后续大量表达即采取该浓度. 将经过诱导的菌破碎后离心, 取离心产物电泳, 结果只在沉淀中见大量目的产物(图 2(b)), 表明产物以包涵体形式存在.

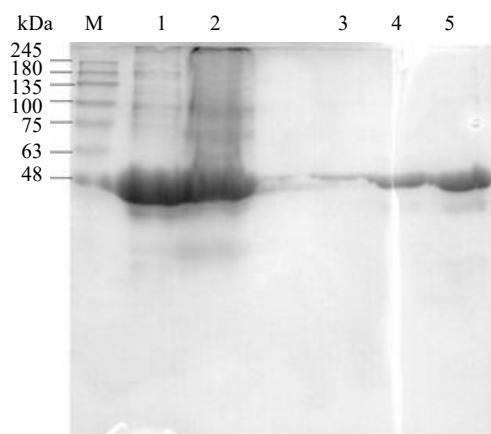


(a)全菌 SDS-PAGE 电泳图 (b)菌裂解液沉淀
M: 蛋白质分子量标记; 泳道 1: 未诱导;
泳道 2~6: IPTG 浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹.

图2 SDS-PAGE 鉴定 pET-28a-PApoB 的诱导表达

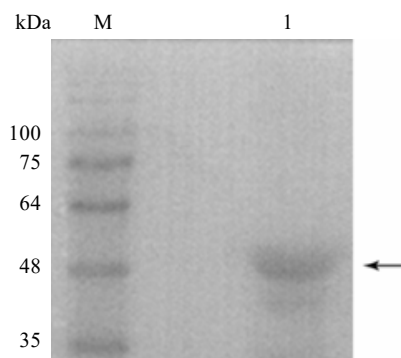
2.3 PApoB 的纯化和 Western blot 鉴定

包涵体经过柱和洗涤后,洗脱液中含有 48 kDa 的目的条带(图 3)。WB 分析中,OPD 显色后,在 PVDF 膜上清楚地显示出一条与目标蛋白迁移率一致的条带(图 4),表明所得重组蛋白能够被 ApoB 抗体识别,说明 pET-28a-PApoB 融合表达蛋白成功地在细菌中表达。



泳道 1~2: 重组质粒 pET-28a-PApoB 转化菌超声波破碎后,经过包涵体洗涤缓冲液多次洗涤的沉淀;泳道 3~5: 过柱纯化洗脱液。

图 3 SDS-PAGE 鉴定 pET-28a-PApoB 的纯化



泳道 M: 蛋白质预染 maker;

泳道 1: 重组蛋白 pET-28a-PApoB 的免疫印迹。

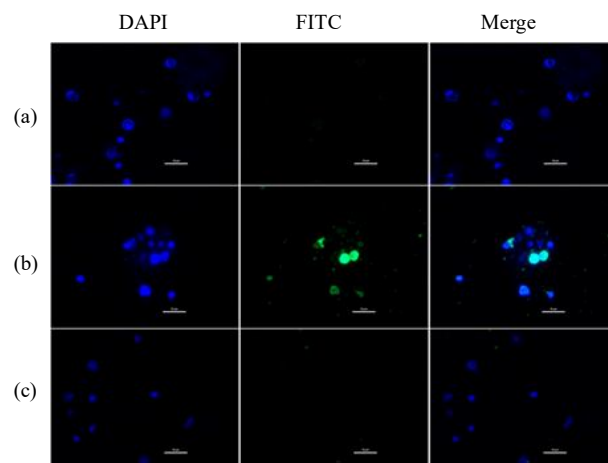
图 4 WB 鉴定 PApoB 在大肠杆菌中的表达

2.4 PApoB 阻断 STSSSV 感染

为了检定重组表达的可溶性 PApoB 是否可以抑制病毒 STSSSV 的感染,取甲鱼血和肝细胞进行了体外感染阻断实验,结果如图 5 和图 6 所示。其中 STSSSV-FITC、重组 PApoB 与细胞共孵育为实验组;STSSSV-FITC、PBS 与细胞共孵育为对照组;PBS 与血细胞孵育为空白组。

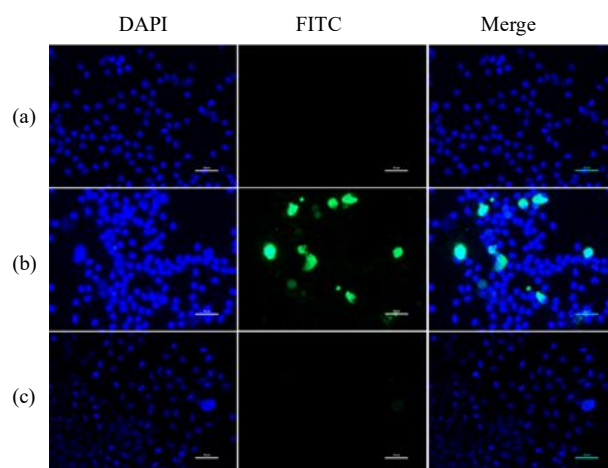
在荧光显微镜下 FITC 绿色荧光信号指示 STSSSV。空白组细胞没有检测到 FITC 荧光信号,

说明细胞没有本底荧光显色(图 5(a)和图 6(a))。没有添加 PApoB,但添加了 FITC-STSSSV 的对照组细胞的绿色荧光信号强(图 5(b)和图 6(b)),而添加 PApoB+FITC-STSSSV 的实验组(图 5(c)和图 6(c))荧光信号相较于对照组显著减弱,说明重组蛋白对 STSSSV 病毒的感染具有明显的抑制作用。



(a): PBS 与肝细胞孵育作为空白组; (b): STSSSV-FITC、PBS 与肝细胞共孵育作为对照组; (c): STSSSV-FITC、重组 PApoB 与肝细胞孵育作为实验组; 细胞核用 DAPI 染色; 标尺: 10 μ m。

图 5 用 PApoB 阻断 STSSSV 感染甲鱼肝细胞



(a): PBS 与血细胞孵育作为空白组; (b): STSSSV-FITC、PBS 与血细胞共孵育作为对照组; (c): STSSSV-FITC、重组 PApoB 与血细胞作为实验组; 细胞核用 DAPI 染色; 标尺: 10 μ m。

图 6 用 PApoB 阻断 STSSSV 感染甲鱼血细胞

3 讨论

载脂蛋白 B (Apolipoprotein B, ApoB)是低密度脂蛋白(Low Density Lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(Very Low Density Lipoprotein, VLDL)微粒

的主要蛋白成分. 有报道发现个别病毒需要 ApoB 介导其感染. 包膜病毒中的黄病毒以宿主细胞表面的低密度脂蛋白及其受体(LDL-R)作为内化的受体, 从而侵入细胞完成病毒的增殖过程, 其机制为: 在寄主血管中的黄病毒与 LDL 或 VLDL 融合成 lip-virus 结构(Lipoprotein-Virus Particle, LVP), 吸附到细胞表面, 通过 LDL 或 VLDL 与 LDL-R 识别和互作, 介导 LVP 通过胞吞或胞饮的方式进入细胞, 开启病毒增殖过程^[6-8]. 也有报道显示非包膜病毒中细小 RNA 病毒科中的少数人鼻病毒由 LDL-R 家族受体介导侵入宿主细胞, 但是其中的机制尚不明确^[9-11].

病毒与宿主细胞间的识别、结合是病毒感染的关键步骤. 受体在宿主细胞与病毒的相互作用中起着极其重要的作用. 病毒受体是指能特异性地与病毒结合, 介导病毒进入, 启动病毒感染的宿主细胞膜组分^[12]. 病毒受体研究为抗病毒药物的研发提供了新思路 and 靶标, 阻断病毒与受体的结合可抑制病毒的感染, 途径包括: 通过抗体封闭细胞表面受体或病毒表面抗原表位, 从而有效地抑制病毒与受体的结合, 抑制病毒对宿主细胞的感染; 添加受体的可溶性配基, 使其与病毒去竞争受体的结合位点, 从而抑制病毒对宿主的感染; 添加游离的溶解态受体组分, 使其与细胞表面的受体去竞争病毒的受体识别位点, 从而抑制病毒对宿主的感染等^[12-16].

STSSSV 属于细小 RNA 病毒科, 前面研究发现, 甲鱼 ApoB 能与 STSSSV 结合, 通过 ApoB 抗体封闭甲鱼细胞表面的 ApoB 可以抑制 STSSSV 感染, 甲鱼 ApoB 可能作为受体介导 STSSSV 感染^[4]. 为了进一步验证 PApoB 的受体功能, 并研制潜在的抗 STSSSV 感染制剂, 本研究用大肠杆菌大量表达, 并纯化了重组可溶蛋白 PApoB, 对其进行了体外阻断试验.

在感染阻断试验中, 用 FITC 标记的 STSSSV (FITC-STSSSV)对甲鱼的肝细胞和血细胞攻毒后, 观察细胞, 在荧光显微镜下可以见到大量的 FITC 绿色荧光信号. 而将 FITC-STSSSV 与重组表达的可溶态 PApoB 孵育, 对甲鱼的肝细胞和血细胞攻毒, 绿色荧光极显著地降低, 表明细胞吸附、感染 STSSSV 的量显著降低了, 重组 PApoB 对 STSSSV

的感染具有明显的抑制作用.

重组 PApoB 制备方便、成本低. 本实验结果可为 STSSSV 临床药物的开发提供新的思路以及实验依据.

参考文献:

- [1] 李登峰, 彭娇, 周永强, 等. 基于卵黄抗体的甲鱼系统性败血症球状病毒间接 ELISA 检测方法: CN102901816A [P]. 2013-01-30.
- [2] 夏小磊, 李登峰, 彭娇, 等. 基于 IgY 的 ELISA 定量检测甲鱼系统性败血症球状病毒[J]. 宁波大学学报(理工版), 2016, 29(4):13-19.
- [3] Zhang L P, Li D F, Liu L G, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 221:39-45.
- [4] Chen M J, Li D F, Fang J, et al. Apolipoprotein mediates soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus (STSSSV) infection[J]. Aquaculture, 2017, 473:501-507.
- [5] Fang J, Li D F, Xu R, et al. Tubulin mediates *Portunus trituberculatus* reovirus infection[J]. Aquaculture, 2015, 448:196-202.
- [6] Agnello V, Ábel G, Elfahal M, et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(22):12766-12771.
- [7] André P, Komurianpradel F, Deforges S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles[J]. Journal of Virology, 2002, 76(14):6919-6928.
- [8] Popescu C I, Dubuisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry[J]. Biology of the Cell, 2010, 102(1):63-74.
- [9] Baravalle G, Brabec M, Snyers L, et al. Human rhinovirus type 2-antibody complexes enter and infect cells via Fc-gamma receptor IIB1[J]. Journal of Virology, 2004, 78(6):2729-2737.
- [10] Dreschers S, Dumitru C A, Adams C, et al. The cold case: Are rhinoviruses perfectly adapted pathogens?[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2007, 64(2):181-191.
- [11] Kumar M, Blaas D. Human rhinovirus subviral a particle binds to lipid membranes over a twofold axis of icosahedral symmetry[J]. Journal of Virology, 2013,

- 87(20):11309-11312.
- [12] Haywood A M. Virus receptors: Binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure[J]. Journal of Virology, 1994, 68(1):1-5.
- [13] Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith D R. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2[J]. Archives of Virology, 2004, 149(5):915-927.
- [14] Li D F, Zhang M C, Yang H J, et al. Beta-integrin mediates WSSV infection[J]. Virology, 2007, 368(1):122-132.
- [15] Tamura M, Natori K, Kobayashi M, et al. Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules[J]. Archives of Virology, 2003, 148(9):1659-1670.
- [16] Casasnovas J M. Virus-receptor interactions and receptor-mediated virus entry into host cells[J]. Sub-cellular Biochemistry, 2013, 68:441-466.

Preparation and STSSSV infection blocking assay of recombinant PApoB

XU Lihua, GU Yehua, CHEN Meijuan, LI Dengfeng*

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology of Ministry of Education,
Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: The current study was aimed to prepare the recombinant protein of *Pelodiscus sinensis* Apolipoprotein B (PApoB) and examine whether the recombinant PApoB has the function of blocking the infection of soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) systemic septicemia spherical virus (STSSSV). Primers were designed referring to PApoB gene to amplify a 1 277 bp fragment. The fragment was ligated into the expression vector pET-28a(+). Subsequently, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta and was induced by the thiogalactoside (IPTG). PApoB was purified by affinity chromatography. Following the incubation of FITC-labeled STSSSV and recombinant PApoB, the soft-shelled turtle cells were challenged and observed under fluorescence microscope. Results showed that the fluorescence signal of the virus in the PApoB-supplemented groups was significantly lower than that of the non-PApoB-addition groups. The results indicate that the recombinant protein was effective to inhibit the infection of STSSSV.

Key words: soft-shelled turtle; apolipoprotein B; STSSSV; prokaryotic expression; blocking infection

(责任编辑 韩 超)