

大菱鲆红体病虹彩病毒主要衣壳蛋白 基因在毕赤酵母中的重组分泌表达

吴成龙^{1,2} 史成银^{1*} 黄 捷¹ 孔晓瑜²

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²教育部海水养殖重点实验室 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘 要 依据大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot viral reddish body iridovirus, TRBIV)主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因序列,设计了一对特异性引物,并在正反向引物中分别引入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点,从而将 PCR 扩增得到的 TRBIV MCP 基因双酶切后定向克隆到真核表达载体 pGAPZ α A 的 GAP 启动子的下游位点,并电转化入大肠杆菌 DH5 α 宿主菌内。经抗生素 Zeocin 筛选、PCR、*EcoR* I 和 *Not* I 双酶切以及测序分析,构建了含有 α -factor 信号肽的真核重组表达载体 pGAPZ α A MCP。重组表达质粒 pGAPZ α A MCP 经 *Avr* II 单酶切后电转入毕赤酵母 X-33 中,挑选阳性克隆,提取表达上清经 SDS-PAGE 和 Western-blot 免疫印迹分析。结果显示,TRBIV MCP 基因在酵母中成功实现分泌表达。阳性重组酵母菌经过 72 h 诱导培养后,重组 TRBIV MCP 的表达量高达 60.2 μ g/ml 左右。

关键词 大菱鲆红体病虹彩病毒 主要衣壳蛋白 毕赤酵母 表达

中图分类号 S943;S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)03-0055-07

Expression of major capsid protein gene of turbot reddish body iridovirus in *Pichia pastoris*

WU Cheng-long^{1,2} SHI Cheng-yin^{1*} HUANG Jie¹ KONG Xiao-yu²

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 26607)

(²Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT A pair of PCR primers, with *EcoR* I and *Not* I restricted enzyme sites in the 5' and 3' end respectively, was designed according to the major capsid protein (MCP) gene of turbot viral reddish body iridovirus (TRBIV). After PCR amplification, a recombinant expression vector including α -factor peptide and 6 \times His tag was constructed by inserting TRBIV MCP gene into GAP promoter downstream of pGAPZ α A directly. The constructed vector pGAPZ α A MCP was linearized by *Avr* II, and then transformed and intergrated into the host *Pichia pastoris* X-

国家自然科学基金项目(30471338)、国家重点基础研究发展计划项目(2006CB101802)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金项目和国家 863 计划项目(2006AA100309)共同资助

* 通讯作者。E-mail: shicy@ysfri.ac.cn, Tel: (0532) 85823062

收稿日期:2008-04-22;接受日期:2008-05-20

作者简介:吴成龙(1979-),男,博士研究生,主要从事水产养殖动物病害和免疫学研究。E-mail: wuchenglong2007@yahoo.com.cn

33 genome by electroporation. The recombinant yeasts with high-level secreted expression of MCP were screened by ELISA-Dot. The expressed proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot. The results revealed that a recombinant protein with the molecular weight of approximately 51kDa was secreted into the supernatant from the recombinant yeast cells successfully. The expressional amount of TRBIV MCP could reach to 60.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the supernatant secreted from recombinant yeast after being fermented at 28 °C for 72 h.

KEY WORDS Turbot reddish body iridovirus Major capsid protein Expression
Pichia pastoris

大菱鲆红体病虹彩病毒(Turbot reddish body iridovirus, TRBIV)是 2003 年发现的感染我国养殖大菱鲆的一种新的鱼类虹彩病毒,它可以引起大菱鲆病毒性红体病(Viral reddish body syndrome, VRBS),并导致养殖大菱鲆大量死亡,严重阻碍大菱鲆养殖业的健康可持续发展(Shi *et al.* 2004)。TRBIV 为具囊膜的大型 DNA 病毒,在分类地位上属虹彩病毒科 Iridoviridae 肿大细胞病毒属 *Megalocytivirus* (史成银等 2005)。肿大细胞病毒属的虹彩病毒是硬骨鱼类主要的病毒性病原,已成为国内外研究的热点(Chinchar *et al.* 2005; Lü *et al.* 2005)。目前在肿大细胞虹彩病毒的病原分子生物学、流行病学、诊断学、感染过程和机理、免疫学等方面的研究均已不同程度地深入到分子水平(He *et al.* 2001; Chao *et al.* 2004; Lü *et al.* 2005; Ao *et al.* 2006; Caipang *et al.* 2006; Go *et al.* 2006),而多个病毒全基因组序列测定的完成也将在最大程度上推动病毒编码蛋白的生物学功能、感染的分子机理以及抗病毒特效药物等方面研究的深入。

国内外研究发现,虹彩病毒的主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)不仅是病毒的抗原相关蛋白,而且在病毒的包装和感染过程中发挥重要作用(Nakajima *et al.* 1998; Qin *et al.* 2002; Caipang *et al.* 2006)。但是,目前 TRBIV 的体外敏感细胞系尚未成功建立,难以通过体外培养细胞对 TRBIV 进行大量增殖从而应用于病毒学基础研究和制备病毒灭活疫苗。因此,利用基因重组技术和体外表达系统获得具有生物学活性的 TRBIV MCP 重组蛋白,具有重要的意义。

毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统是近年来发展起来的一类能够有效表达重组蛋白的真核表达系统(Cereghino *et al.* 2000),其表达的蛋白能进行正确的翻译后加工和折叠,从而实现具有生物学活性目的蛋白的高效表达(Sreekrishna *et al.* 1997)。同时,成熟的高密度发酵技术为目的蛋白的工业化生产提供捷径。目前该系统已在多种基因工程表达蛋白质中得到了应用,但国内外至今尚未见该系统应用于 TRBIV MCP 重组表达的报道。鉴于 MCP 在 TRBIV 中的重要作用,本研究构建了 TRBIV MCP 的酵母重组表达载体并在毕赤酵母中诱导其成功表达,这为 TRBIV 的早期诊断、特效治疗药物的研究、在分子水平寻找 TRBIV 的宿主相互作用蛋白以及病毒的分子致病机理等研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病 鱼

用于病毒 PCR 扩增的患病大菱鲆,由黄海水产研究所病研室研究人员于 2003 年 11 月取自山东省烟台市莱州某发病大菱鲆养殖场。病鱼具有明显的病毒性红体病症状,经电镜观察和 PCR 检测证实病鱼组织内存在 TRBIV 的严重感染。取病鱼的脾、肾等组织冻于 -80 °C 冰箱中备用。

1.1.2 菌种与载体

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (*recA*, *endA*)和毕赤酵母菌 X-33 (*Mut*⁺, *His*⁺)为本实验室保存,真核表达载体 pGAPZ α A 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 酶与试剂

EcoR I、*Not* I、*Pst* I、DNA 聚合酶 Ex Taq 和 T₄ DNA 连接酶均购自大连宝生物工程有限公司, *Avr* II 购

自 NEB 公司, EZNA Gel Extraction Kit (Catalog No. D2501-01) 购自 OMEGA 公司 (USA), High Pure PCR Template Preparation Kit (Catalog No. 11796828001) 购自 Roche Diagnostics GmbH 公司 (USA), Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Catalog No. D4036S) 购自天根生物技术有限公司, 抗生素 Zeocin™ 和抗体 Anti-His-HRP 均购自 Invitrogen 公司 (USA), Tryptone 和 Yeast extract 购自 BBI 公司 (USA), 其他均为国产分析纯试剂。

1.1.4 引物设计与合成

依据 Genbank 中 TRBIV MCP (Accession No.: AY590687) 基因序列, 设计了 TRBIV MCP 正向和反向引物, 依据真核表达载体 pGAPZ α A 上的酶切位点以及 MCP 核酸序列上的酶切特性, 分别在正向引物引入限制性内切酶 *EcoR* I 识别位点 (GAATTC), 在反向引物引入限制性内切酶 *Not* I 识别位点 (GCGGCCGC), 合成引物对 PVM1: 5'-CTGAATTCTCTGCAATCTTAGGTG-3' 和 PVM2: 5'-AAGCGGCCGCCAGGATAGGGAAG-3', 另外按照 Invitrogen 公司 pGAPZ 手册提供的引物序列合成一对载体 pGAPZ α A 自身引物, pGAP Forward: 5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3' 和 3'AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3', 用于阳性重组酵母菌的筛选。以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 的提取与目的基因的 PCR 扩增

取患病大菱鲆的脾脏或肾脏组织 50 ~ 60 mg, 采用 High Pure PCR Template Preparation Kit 进行 PCR 模板的制备, 具体操作按试剂盒说明书进行, 最后溶解在 40 μ l pH 8.0 的 10 mmol/L Tris 缓冲液中备用。

对提取的病毒 DNA 样品, 利用引物对 PVM1/PVM2 进行 TRBIV MCP 的 PCR 扩增, PCR 扩增的总体积为 50 μ l, 反应体系包括: 10 \times PCR buffer (10 mmol/L Tris - HCl pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5% Tween-20) 5 μ l, dNTPs (250 μ mol/L) 5 μ l, Takara Ex Taq 酶 1U, 病毒 DNA 模板 1 μ l, 正向和反向引物 (10 μ mol/L) 各 2.5 μ l。PCR 扩增使用英国 Thermo Hybaid 公司的 PCR Express 仪进行。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 取 2 μ l 反应产物在含有核酸染料 Genefinder™ 的 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 用 FujiFilm 凝胶成像系统照相用于分析。其余 PCR 产物用 EZNA Gel Extraction Kit 纯化回收目的片断, 具体操作按试剂盒说明书进行, 最后溶解在 20 μ l pH 8.0 的 10 mmol/L Tris 缓冲液中。

1.2.2 重组表达载体的构建

将纯化回收的 MCP 基因产物用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后, 与经相同酶切后得到的表达载体 pGAPZ α A 在 16 $^{\circ}$ C T₄ DNA 连接酶的作用下连接过夜, 连接产物电转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板培养挑取单菌落, 接种于 LB 培养液 (含抗生素 Zeocin™ 25 μ g/ml) 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 使用 Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit 小量提取质粒, 酶切鉴定重组质粒。选取阳性克隆送上海博亚生物工程有限公司测序, 验证其阅读框插入是否正确, 将鉴定正确的重组质粒命名为 pGAPZ α A MCP。

1.2.3 重组表达载体的酵母转化及转化子的筛选与鉴定

参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母操作手册制备酵母 X-33 感受态细胞。取 80 μ l 感受态酵母细胞与 10 μ l *Avr* II 线性化的重组表达质粒混合, 注入预冷的 2 mm 电转杯中, 冰浴 5 min, 在 Bio-Rad GenePulser 电转仪 1 500 V、5 ms 条件下电转化后, 立即加入 1 ml 预冷的山梨醇混匀。取 50、100 和 300 μ l 菌液涂布于 YPDS (含抗生素 Zeocin™ 100 μ g/ml) 抗性选择平板上, 28~30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2~4 d。挑取单菌落, 接种于 YPD (含抗生素 Zeocin™ 100 μ g/ml) 培养液中 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 按奥斯伯等 (1998) 的方法提取酵母基因组 DNA, 利用引物对 PVM1/PVM2 和 pGAP/3'AOX1 进行 PCR 鉴定, 反应条件同 1.2.1, 将阳性重组酵母命名为 X-33/pGAPZ α A MCP。

1.2.4 高表达量转化子的筛选

参考谢琪璇等 (2004) 对阳性重组酵母转化子进行快速筛选, 经 Zeocin™ 100、300、900 和 2 700 μ g/ml 浓度梯度加压筛选, 最后将 NC 膜用 50 g/L 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 3 h, PBST 洗涤后加入 Anti-His-HRP, 37 $^{\circ}$ C 孵

育 60 min, PBST 洗涤后用 DAB 显色液显色, 用 FujiFilm 凝胶成像系统照相进行分析。

1.2.5 阳性重组酵母菌株的发酵与表达产物的 SDS-PAGE 分析

将转化的单克隆重组酵母菌 X-33/pGAPZ α A MCP 分别接种于 3 ml YPD+ZeocinTM 培养基中, 30 °C、240~280 r/min 培养 24~48 h, 至菌体 OD₆₀₀ 值为 2~6, 室温离心 5 min 收获菌体。菌体沉淀用 20 ml YPDS+ZeocinTM 培养液悬浮, 在 25~28 °C、240~280 r/min 条件下诱导培养 72 h。诱导培养结束后, 将培养液在 5 000 r/min 室温离心 5 min, 收集上清。分别取 10 μ l 表达菌液上清加等量 1 \times SDS 样品缓冲液, 于 100 °C 煮沸, 取 10 μ l 样品上样, 做 SDS-PAGE 电泳检测。取等量酵母菌 X-33 的菌液上清做相同处理作为对照组。电泳结束后用 FujiFilm 凝胶成像系统照相, 利用 Multi Gauge3.0 软件对 TRBIV MCP 的表达量进行分析。具体方法是将电泳图谱进行背景灰度校正后, 测定每条电泳条带的灰度(光密度值), 然后将待测条带光密度值与分子量相近的 Marker 蛋白(10 μ g/ml)光密度值相比较, 计算出待测条带的蛋白含量, 并以 SPSS 13.0 和 Excel 软件进行数据统计分析。

1.2.6 表达产物的免疫印迹分析

将 X-33 原始菌株(阴性对照样品)和阳性重组酵母菌低温诱导培养 72 h 后的表达上清, 首先采用 SDS-PAGE 电泳将蛋白带分离开。通过恒压电转将 SDS-PAGE 电泳蛋白带转移到 NC 膜上, 用 50 g/L 脱脂奶粉 37 °C 封闭 3 h, PBST 洗涤后, 再用 Anti-His-HRP 单克隆抗体, 37 °C 孵育 60 min, PBST 洗涤后用 DAB 显色液显色, 用 FujiFilm 凝胶成像系统照相进行分析。

2 结果

2.1 重组表达载体 pGAPZ α A MCP 的构建和鉴定

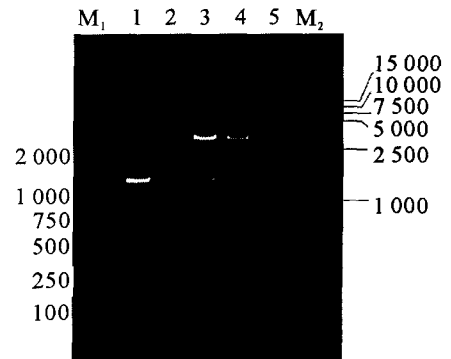
以 TRBIV DNA 为模板, 用引物对 PVM1/PVM2 进行 PCR 扩增, 得到 1 条大小约 1 400 bp 的单一目标条带, 即两端含相应酶切位点的 TRBIV MCP 基因。将该 PCR 产物回收、*EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 克隆到表达载体 pGAPZ α A 中, 然后电转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板培养。挑取阳性单菌落, 利用 PVM1/PVM2 引物对进行菌落 PCR 鉴定, 得到约 1 400 bp 的目标扩增产物(图 1)。然后将该单菌落接种于 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜, 提取质粒进行 *EcoR* I、*EcoR* I/*Pst* I、*EcoR* I/*Not* I 酶切鉴定, 结果与预期相符(图 1)。阳性质粒的测序结果表明, 阅读框插入正确, 没有移码错配, 说明重组型表达载体 pGAPZ α A MCP 构建成功。

2.2 阳性重组酵母菌的筛选与鉴定

用构建的重组表达载体 pGAPZ α A MCP 转化酵母菌 X-33 感受态细胞, 涂板培养挑取单菌落, 接种于 YPD+ZeocinTM 培养液中, 振荡培养过夜, 提取酵母基因组 DNA, 以引物对 PVM1/PVM2 和 pGAP/3'AOX1 进行酵母基因 PCR 分析和鉴定, 分别获得了约 1 400 bp 和 1 850 bp 的目标产物, 说明线性真核表达载体已经成功整合进入酵母菌基因组中(图 2)。

2.3 高表达量阳性重组酵母菌的筛选

使用谢琪璇等(2004)建立的阳性重组酵母转化子快速筛选技术, 经 ZeocinTM 100、300、900 和 2700 μ g/ml 浓度梯度加压筛选, 对 150 余株阳性重组酵母转化菌株进行了



1: 菌落 PCR 结果, 2: 重组表达质粒 pGAPZ α A MCP, 3: *EcoR* I/*Not* I 酶切结果, 4: *EcoR* I/*Pst* I 酶切结果, 5: *EcoR* I 酶切结果, M1: Marker DL 2 000, M2: Marker DL 15 000

Lane 1: PCR product amplified with primers PVM1/PVM2. Lane 2: Recombinant vector pGAPZ α A MCP. Lane 3: Restriction digestion of recombinant vector pGAPZ α A MCP with *EcoR* I/*Not*I. Lane 4: Restriction digestion of recombinant vector pGAPZ α A MCP with *EcoR* I/*Pst* I. Lane 5: Restriction digestion of recombinant vector pGAPZ α A MCP with *EcoR* I. M1: DNA marker DL 2 000. M2: DNA marker DL 15 000

图 1 重组表达载体 pGAPZ α A MCP 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification and restriction digestion of recombinant vector pGAPZ α A MCP

高表达量菌株的筛选工作,利用 Multi Gauge3.0 软件对印迹斑点进行分析(图 3),初步选择了 20 株高表达量阳性酵母菌株。

2.4 重组酵母菌表达产物的 SDS-PAGE 检测

根据实验 2.3 的分析结果,随机选择 7 株高表达阳性酵母菌株,对其进行发酵培养,分别在诱导 24、48 和 72 h 后取其发酵上清经过透析处理后利用 SDS-PAGE 进行检测。图 4 所示为 1[#] 阳性酵母菌株不同发酵时间培养上清的 SDS-PAGE 检测结果。可以看出,重组酵母菌的发酵上清中明显存在一大大小为 51 kDa 左右的目标条带(图 4 中箭头所示),而原始酵母菌 X-33 的发酵上清中没有该条带。以上结果初步说明 TRBIV MCP 在酵母菌中已获表达。利用 Multi Gauge3.0 软件对 TRBIV MCP 的表达量进行分析,结果显示,重组酵母菌经过 72 h 诱导培养后,TRBIV MCP 的表达量达到最高值,蛋白含量测定显示其表达量可高达 60.2 μg/ml 左右(图 5)。

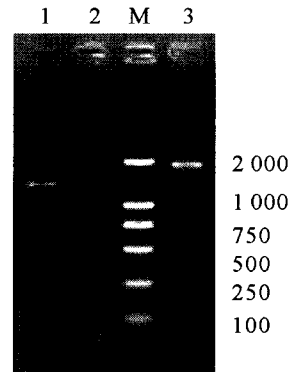
2.5 表达产物的 Western blot 分析

将 X-33 和 1[#] 阳性重组酵母菌低温诱导培养 72 h 后的表达上清,首先采用 SDS-PAGE 电泳将蛋白带分离开,然后通过恒压电转将 SDS-PAGE 电泳蛋白带转移到 NC 膜上,再用 Anti-His-HRP 单克隆抗体,进行 Western blot 分析,结果如图 6 所示。由图 6 可见,在阳性重组酵母菌上清的泳道中于 51 kDa 左右出现一印迹(箭头所示),而未导入线性重组质粒 pGAPZαA MCP 的原始酵母菌 X-33 的上清中没有这一条带,由此说明目的蛋白成功表达并分泌到发酵上清中。

3 讨论

与大肠杆菌、酿酒酵母、杆状病毒和哺乳动物细胞等表达系统相比,毕赤酵母表达系统具有表达量高、遗传稳定性高、具翻译后加工修饰功能、外源蛋白生物活性高、表达方式灵活、自身分泌蛋白少、外源蛋白糖基化程度低和易进行高密度发酵等优点,是一个被广泛应用的高效真核表达系统,常用来大规模表达真核生物或病毒蛋白(Vassileva *et al.* 2001),以获得大量纯化的表达产物为免疫抗原或做功能特性的研究。本研究所采用的表达载体 pGAPZαA 含有强启动子甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAP),能够实现外源基因的组成型高效表达。该载体的强启动子下游融合酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 α-因子信号肽序列,能有效介导外源蛋白分泌到胞外。由于该启动子不需甲醇诱导,故在大规模发酵过程中具有安全的优点。此外,pGAPZαA 载体为穿梭载体,利用该载体的 Zeocin™ 抗性,可在原核与真核系统中进行快速抗性筛选。同时载体的 C-myc 和 6×His tag 抗原决定簇可用于外源蛋白检测,6×His tag 表达系统除了具有高效表达的特点外,不仅有检测方便的优点,还有利于外源蛋白的纯化等后续研究工作的开展。因此,本文作者使用了这一系统来表达 TRBIV MCP。

TRBIV 是一种能引起大菱鲃病毒性红体病的新型虹彩病毒,对于我国大菱鲃养殖业具有较强的危害性。近来国内外研究发现,虹彩病毒的主要衣壳蛋白不仅作为病毒的主要结构蛋白位于病毒粒子的表面,而且在病



1:引物对 PVM1/PVM2 的 PCR 扩增结果, 2: 阴性对照, 3: 引物对 pGAP/3' AOX1 的 PCR 扩增结果, M: Marker DL 2 000

Lane 1: PCR products amplified with primers PVM1/PVM2. Lane 2: The negative control PCR. Lane 3: PCR products amplified with primer pairs pGAP/3' AOX1. M: DNA marker DL2 000

图 2 重组酵母菌基因组的 PCR 鉴定
Fig. 2 PCR amplification of recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZαA MCP)

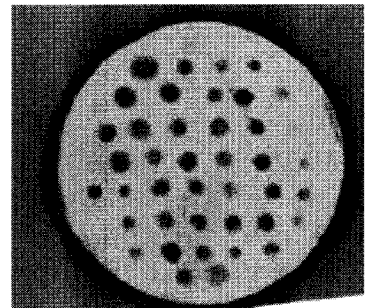
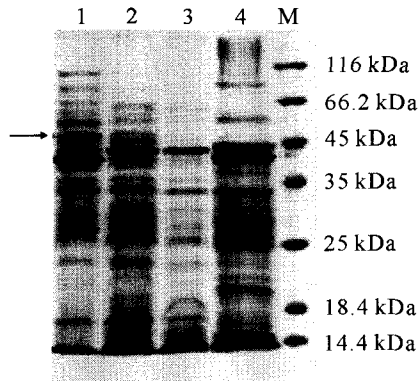


图 3 高表达量阳性重组酵母菌的筛选
Fig. 3 The screening of high secreted recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZαA MCP) from individual transformants

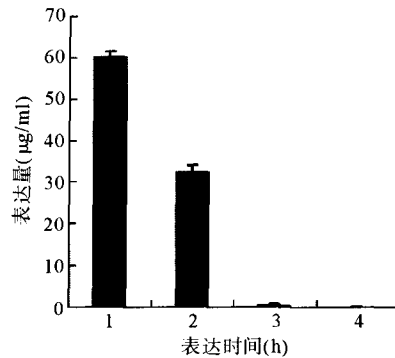
毒的装配和感染过程中起着重要作用,是病毒的主要抗原相关蛋白(Nakajima *et al.* 1998; Qin *et al.* 2002; Caipang *et al.* 2006)。但是到目前为止,关于虹彩病毒功能蛋白的重组表达多用原核表达体系(张敏等 2004; Kim *et al.* 2007; Ao *et al.* 2006),而在真核表达体系尤其是在分泌型毕赤酵母表达系统中表达虹彩病毒功能蛋白的报道较少。本研究以 TRBIV MCP 基因为目的基因,首次将 TRBIV MCP 基因与酵母表达载体 pGAPZ α A 定向连接并成功表达。重组 MCP 在毕赤酵母中的可溶性高效表达,不仅是 TRBIV 血清学早期诊断试剂研发的前提,也为研制抗病毒特效药物和病毒疫苗提供了重要手段。



1: 发酵 72 h 的 1[#] 重组酵母培养上清,箭头所示为约 51 kDa 的重组蛋白条带。2: 发酵 48 h 的 1[#] 重组酵母培养上清。3: 发酵 24 h 的 1[#] 重组酵母培养上清。4: X-33 原始菌株发酵上清。M: Marker Lane 1: Supernatant sample of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 72 h. Lane 2: Supernatant sample of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 48 h. Lane 3: Supernatant sample of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 24 h. Lane 4: Supernatant sample of non-transformed *Pichia pastoris* X-33. M: Low Molecular Weight Protein Marker

图 4 1[#] 重组酵母菌表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 Expression of TRBIV MCP in recombinant *Pichia pastoris* X-33

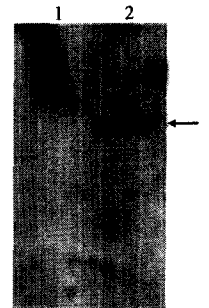


1: 72 h 诱导培养后, TRBIV MCP 在重组酵母菌分泌蛋白中的含量。2: 48 h 诱导培养后, TRBIV MCP 在重组酵母菌分泌蛋白中的含量。3: 24 h 诱导培养后, TRBIV MCP 在重组酵母菌分泌蛋白中的含量。4: X-33 原始菌株发酵上清

1: Expression amount of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 72 h. 2: Expression amount of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 48 h. 3: Expression amount of TRBIV MCP in 1[#] recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP) at time of 24 h. 4: Control sample of non-transformed *Pichia pastoris* X-33

图 5 TRBIV MCP 表达量的分析

Fig. 5 Expression amount of TRBIV MCP in recombinant *Pichia pastoris* X-33



1: X-33 原始菌株, 2: 阳性重组酵母, 箭头所示为约 51 kDa 的重组蛋白条带

Lane 1: Supernatant sample from control yeast strain X-33. Lane 2: Supernatant sample from positive recombinant *Pichia pastoris* (X-33/pGAPZ α A MCP)

图 6 重组酵母发酵上清的 Western-Blot 检测

Fig. 6 Western blot detection of expressed TRBIV MCP in recombinant *Pichia pastoris* X-33

TRBIV MCP 的理论分子量约为 49 kDa,但由于构建的重组蛋白的两端均含有融合蛋白,因而表达的重组多肽的分子量往往比理论值要大一些。刘庆慧等(2005)对 WSSV VAP1 的生物活性研究结果表明,C 端融合蛋白序列的引入并不会影响重组蛋白的生物活性。Tamaru 等(2006)利用酿酒酵母表达系统对真鲷虹彩病毒(Red sea bream iridovirus, RSIV)的 MCP 进行了重组表达,但是表达出的重组蛋白组成型地呈现于酵母细胞表面,难以大规模提取和纯化。而本实验得到的高表达重组 TRBIV MCP 蛋白产物是可溶性的存在于酵母细胞外,因此有助于提取和纯化具有生物活性的重组蛋白。以上这些特性为下一步应用免疫共沉淀技术筛选 TRBIV MCP 与脾细胞相互作用蛋白的研究打下了基础,对于深入了解 TRBIV 的致病机制也具有一定的意义。

参 考 文 献

- 史成银,王印庚,黄 健,王清印. 2005. 中国大菱鲆虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的 PCR 扩增及序列分析. 中国水产科学, 12(5): 588~593
- 刘庆慧,韩文君,黄 健,王清印. 2005. WSSV-VAP1 基因克隆及在毕赤酵母中的表达. 高技术通讯, 15(5):67~70
- 张 敏,白俊杰,劳海华,叶 星,简 清,罗建仁. 2004. 鳃传染性脾坏死病毒主要衣壳蛋白基因的原核表达. 中国病毒学, 19(2): 137~140
- 谢琪璇,肖鑫娟,潘善培,余 巍,彭雅林,张春雪. 2004. 一种快速筛选巴氏毕赤酵母高表达克隆的新方法. 暨南大学学报(医学版), 25(6): 713~716
- 奥斯伯, F. M., 金斯顿, R. E., 赛德曼, J. G., 斯特拉尔, K., 布伦特, R., 穆尔, D. D., 史密斯, J. A. (马学军, 舒跃龙等译). 1998. 精编分子生物学实验指南. 第4版. 北京:科学出版社
- Ao, J., and Chen, X. 2006. Identification and characterization of a novel gene encoding a RGD-containing protein in large yellow croaker iridovirus. *Virology*, 355(2): 213~222
- Caipang, C. M., Takano, T., Hirano, I., and Aoki, T. 2006. Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV). *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 130~138
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1): 45~66
- Chao, C. B., Chen, C. Y., Lai, Y. Y., Lin, C. S., and Huang, H. T. 2004. Histological, ultrastructural, and *in situ* hybridization study on enlarged cells in grouper *Epinephelus* hybrids infected by grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Disease of Aquatic Organisms*. 58: 127~142
- Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V., and Williams, T. 2005. Iridoviridae. In: Fauquet CM, Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (eds) *Virus taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier=Academic Press, London. 145~162
- Go, J., Lancaster, M., Deece, K. *et al.* 2006. The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod (*Maccullochella peelii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. *Molecular and Cellular Probes*. 20: 212~222
- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., and Chan, S. M. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, 291:126~139
- Kim, Y. I., Ha, Y. M., Ahn, S. J., Nam, Y. K., Kim, K. H., and Kim, S. K. 2007. Production and characterization of polyclonal antibody against recombinant ORF 049L of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) iridovirus. *Process Biochemistry*, 42: 134~140
- Lü, L., Zhou, S. Y., Chen, C., Weng, S. P., Chan, S. M., and He, J. G. 2005. Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, 339:81~100
- Nakajima, K., Maeno, Y., Yokoyama, K., Kaji, C., and Manabe, S. 1998. Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridovirus. *Fish Pathology*, 33(2):73~78
- Qin, Q. W., Shi, C. Y., Gin, K. Y. H., and Lam, T. J. 2002. Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp. *Journal of Virological Methods*, 106: 89~96
- Shi, C. Y., Wang, Y. G., Yang, S. L., Huang, J., and Wang, Q. Y. 2004. The first report of an iridovirus-like gent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, 236: 11~25
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., and Birkenberger, L. A. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1): 55~62
- Tamaru, Y., Ohtsuka, M., Kato, K., Manabe, S., Kuroda, K., Sanada, M., and Ueda, M. 2006. Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells; A first step for the development of an oral Vaccine. *Biotechnology Progress*, 22(4): 949~953
- Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., and Khanna, N. 2001. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology*, 88(1):21~35