

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒衣壳蛋白基因在毕赤酵母中的表达

彭小莉^{1,2}, 谢明星², 刘 棠², 陈双雅², 王群力², 陈伟玲², 王景明², 张其清^{1,*}

(1. 厦门大学生物医学工程研究中心, 福建厦门 361005;

2. 厦门出入境检验检疫局, 福建厦门 361012)

摘要:对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒是“须向OIE申报的甲壳动物重要疾病”之一。将该病毒主要结构蛋白基因克隆至毕赤酵母穿梭表达质粒pPIC9K, 构建重组表达载体(命名为pPIC9K-IV), 限制性内切酶*Bgl*I 对其进行酶切线性化, 采用电穿孔法转化到毕赤酵母GS115宿主菌。采用PCR方法分析和G418筛选来鉴定重组的毕赤酵母, 诱导表达的产物分别进行ELISA分析或Western blot免疫印迹鉴定, 分泌表达产物分子量大小为40ku左右, 原核表达时制备的兔抗对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒衣壳蛋白的血清可与真核表达的目的蛋白发生特异性反应。

关键词:传染性皮下及造血组织坏死病毒, 衣壳蛋白, 毕赤酵母, 真核表达

Expression of the coat protein gene of IHHNV in shrimp in *Pichia Pastoris*

PENG Xiao-li^{1,2}, XIE Ming-xing², LIU Tang², CHEN Shuang-ya², WANG Qun-li², CHEN Wei-ling², WANG Jing-ming², ZHANG Qi-qing^{1,*}

(1. Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Xiamen Exit and Entry Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China)

Abstract: The infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus is one of the main diseases of the penaeid shrimp. The gene of coat protein of IHHNV was constructed into *Pichia Pastoris* secretory expression vectors pPIC9K, named pPIC9K-IV. The recombinant plasmid pPIC9K-IV was linearized with *Bgl*I, and then was transformed into *Pichia Pastoris* GS115 by electroporation. After PCR analysis and G418 screening, the pPIC9K-IV recombinant was expressed with 0.8% (V/V) methanol. The expression product was confirmed by Western blot and ELISA analysis. The results showed that the coat protein was successfully expressed, its product was about 40ku, and could be recognized specifically by rabbit polyclonal anti-serum.

Key words: infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus (IHHNV); coat protein; *Pichia Pastoris*; eukaryotic expression

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0067-04

对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus, IHHNV) 1981年首次在美国夏威夷地区养殖的对虾中发现, 对红额角对虾(*Penaeus stylirostris*)有较高致病性和死亡率, 对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)可导致慢性矮小残缺综合症(runt-deformity syndrome, RDS)^[1]。国际兽疫局(OIE)将该病列为“须向OIE申报的甲壳动物重要疾病”之一^[2]。目前国内外对于IHHNV的研究很多, 比如检测方法的研究^[3-4]、病毒株基因组的序列研究^[5]、病毒结构蛋白的原核表达^[6]等。但是关于IHHNV结构蛋白真核表达的研究很少。本研究选用*P.pastoris*表达体系来表达IHHNV衣壳蛋白, 经

Western blot免疫印迹和ELISA检测分析表达的蛋白抗原性, 证实表达的蛋白具有抗原特异性, 为进一步研制可以快速检测IHHNV的试剂盒奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

毕赤酵母宿主菌GS115、穿梭质粒pPIC9K、大肠杆菌TOP10F及毕赤酵母多拷贝表达载体试剂盒 Invitrogen公司; 感受态细胞 由本实验室制备保存; 酵母基因组DNA提取试剂盒 天根生化科技有限公司; 总病毒DNA抽提试剂盒、质粒DNA抽提试剂盒 泰京生物技术有限公司; PCR产物提取试剂盒、凝胶DNA提取试剂盒 上海Sangon生物工程有限公司; His Trap™ FF Crude 5mL GE公司; D-山梨醇 Sigma-Aldrich公司。

1.2 毕赤酵母分泌型表达载体pPIC9K-IV载体的构建

1.2.1 pPIC9K质粒的提取及双酶切 带有pPIC9K的

收稿日期: 2011-11-09 * 通讯联系人

作者简介: 彭小莉(1980-), 女, 工程师, 研究方向: 食品工程、食品微生物、水产病毒等。

基金项目: 国家质检总局科技基金资助项目(2006IK015)。

菌株DH5 α 接种于LB平板上(含氨苄青霉素 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C培养过夜, 挑取单菌落继续接种于含氨苄青霉素的液体LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养至对数生长期, 收集菌体, 提取pPIC9K质粒DNA。用限制性内切酶*Avr* 和*Not* 同时进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C孵育约6h。酶切产物电泳后, 采用凝胶DNA提取试剂盒回收酶切的pPIC9K质粒片段。

1.2.2 目的基因的获取 根据pPIC9K的单酶切位点*Avr*、*Not* 本研究设计引物如下:

IV-F9-K*avr* (HIS) 5'—CG CCT AGG CAC CAT CAT CAT CAT ATG TGC GCC GAT TCA ACA AG—3'

IV-R9-K*not* 5'—CG GCG GCC GC TTA GTT AGT ATG CAT AAT ATA—3'

下划线部分为酶切位点, 斜体部分是引入的6个组氨酸核苷酸序列, 以PET-IV重组质粒^[6]为模板, 进行PCR扩增, 并将扩增产物进行测序, 测序结果无误后, 用限制性内切酶*Avr* 和*Not* 对PCR产物进行双酶切, 反应条件同1.2.1。酶切后的产物采用PCR产物提取试剂盒提取纯化。

1.2.3 双酶切后的pPIC9K质粒和目的基因片段的连接、转化及鉴定 质粒pPIC9K和目的基因片段按摩尔比为1:4的比例用T4连接酶进行连接。将连接产物转化到*E. coli* Top10F感受态细胞中, 涂布在含有氨苄青霉素(50 μ g/mL)的LB琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C培养过夜。挑取单个菌落, 采用质粒DNA抽提试剂盒提取质粒。用PCR方法和限制性内切酶(*Avr* 和*Not*)双酶切鉴定, 结果正确后再进行测序鉴定。

1.3 电击转化线性化的重组表达载体pPIC9K-IV

1.3.1 重组表达载体pPIC9K-IV的线性化 将经过测序验证正确的含有pPIC9K-IV的*E. coli* Top10F接种至200mL LB液体培养基中, 采用试剂盒抽提大量质粒DNA。将10 μ g的质粒DNA用限制性内切酶*Bgl* 酶切线性化, 反应体系如下: 重组载体质粒10 μ g, 限制性内切酶*Bgl* 4 μ L, 10 \times 酶反应缓冲液10 μ L, 加水至100 μ L, 37 $^{\circ}$ C水浴过夜。酶切产物加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25/24/1, V/V/V)抽提, 收集上层液, 加入两倍体积的无水乙醇沉淀回收DNA片段, 70%乙醇洗涤一次, 沉淀用无菌水溶解, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3.2 毕赤酵母感受态细胞的制备及转化 酵母菌感受态细胞制备见毕赤酵母多拷贝表达载体试剂盒说明书。

80 μ L的毕赤酵母感受态GS115菌体与上述线性化的重组表达质粒混匀, 转入预冷的电转化杯。静置5min。放置在BIO-RAD电转仪上。转化参数如下: 电容25 μ F, 电压1.5kV, 电击时间为4~10ms, 电阻200 Ω 。

电转化后, 立即加入200 μ L预冷的D-山梨醇, 分两种不同浓度的菌液涂布于MD平板, 待平板干燥后, 30 $^{\circ}$ C倒置培养2~3d, 直至单个菌落出现。

1.4 重组毕赤酵母的PCR分析和G418筛选鉴定

1.4.1 重组毕赤酵母基因组的提取和PCR分析 从MD平板挑取单个克隆于5mL的YPD培养基上, 按酵母基因组DNA提取试剂盒操作提取酵母基因组, 分别使

用5' AOX1、3' AOX1和 α -factor等引物配对, 对转化的毕赤酵母重组子进行PCR分析。5' AOX1引物、3' AOX1引物和 α -factor引物序列如下:

5' AOX1引物5'—GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC—3'

α -factor引物5'—TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC—3'

3' AOX1引物5'—GGC AAA TGG CAT TCT GAC ATC CT—3'

1.4.2 遗传霉素G418抗性转化子的筛选 将上述PCR分析阳性的重组毕赤酵母接种于含遗传霉素G418浓度分别为0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、1.75、2.0、3.0及4.0mg/mL的YPD平板上, 2~5d后, 挑选出3~5个含有多拷贝(即在更高浓度遗传霉素G418的YPD平板上生长良好)的重组毕赤酵母。

1.5 IHNV衣壳蛋白的真核表达及纯化

1.5.1 IHNV衣壳蛋白的小量表达 将上述筛选出的多拷贝重组毕赤酵母接种于10mL BMGY液体培养基中, 200r/min振荡, 30 $^{\circ}$ C培养约18h, 5000 \times g离心收集细胞。等体积10mL BMMY液体培养基重悬细胞, 200r/min振荡, 30 $^{\circ}$ C培养。在培养过程中, 每24h补充一次甲醇, 至终浓度为0.8%。在24、48、96、120、144h等时间点收集发酵液, 5000 \times g离心, 取上清用于分析蛋白表达量。表达产物使用三氯乙酸(TCA)浓缩法浓缩, 采用ELISA法进行分析。

1.5.2 IHNV衣壳蛋白的大量表达及纯化 将优化表达的重组毕赤酵母接种于10mL YPD液体培养基中, 200r/min振荡, 30 $^{\circ}$ C培养约18h。吸取6mL菌液至300mL的BMGY中培养约16h, 5000 \times g离心收集细胞。300mL BMMY重悬细胞, 200r/min振荡, 30 $^{\circ}$ C, 甲醇终浓度0.8%诱导表达5~6d, 5000 \times g离心收集上清。表达产物采用TCA浓缩法沉淀, 经透析液透析过夜。透析后的上清液经His Trap亲和层析柱纯化, 最后收集目的蛋白, 分别用于SDS-PAGE电泳和Western blot免疫印迹分析。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增IHNV衣壳蛋白基因

以PET-IV重组质粒^[3]为模板, 采用1.2.2所列引物进行IHNV衣壳蛋白基因的PCR扩增, 得到PCR产物约为990bp, 与实际基因大小相符合(如图1)。PCR产物测序结果无误。

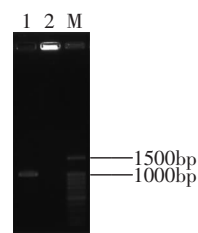


图1 PCR扩增目的基因片段

Fig.1 PCR amplification products

注 M: 100bp标准分子量; 1: PCR扩增的目的基因; 2: 空白对照。

2.2 重组表达载体的鉴定

将构建的重组载体质粒pPIC9K-IV进行*Avr* 和

Not 双酶切,电泳检测结果显示酶切前和酶切后的条带大小跟实际大小一致(如图2)。将pPIC9K-IV质粒测序,测序结果准确。

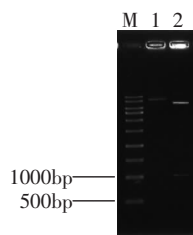


图2 重组质粒pPIC9K-IV的酶切鉴定

Fig.2 Restriction endonuclease analysis of recombinant vectors
注: M:1Kb标准分子量; 1: pPIC9K-IV质粒; 2: pPIC9K-IV酶切(Avr/NotI)。

2.3 重组表达载体转化至毕赤酵母GS115MD平板和G418筛选后YPD平板上的生长

重组质粒pPIC9k-IV利用电穿孔法转化到毕赤酵母GS115后,涂布于MD平板上30℃培养,转化的重组酵母在不含组氨酸的MD平板上,大多数为单个菌落生长(如图3)。PCR分析阳性的重组毕赤酵母接种于含遗传霉素G418浓度为3.0mg/mL的YPD平板上的生长情况(如图4)。

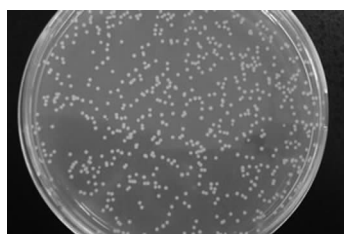


图3 MD平板上生长的重组毕赤酵母

Fig.3 Recombinant clones of *Pichia Pastoris* on MD plates

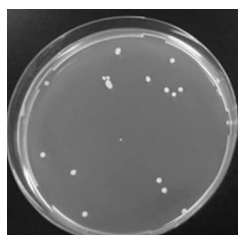


图4 含G418的YPD平板上筛选出的重组毕赤酵母

Fig.4 Recombinant clones of *Pichia Pastoris* on YPD plates containing G418

2.4 重组毕赤酵母小量表达产物的ELISA分析

本研究为实现表达的高效性,优化探索最佳的表达条件,多次反复实验诱导表达的温度和振荡速度,最后选择了较合适的诱导表达温度(30℃)和振荡速度(200r/min)。在利用甲醇进行小量表达过程中,甲醇的诱导终浓度初步实验为由0.5%,后逐步提高到0.7%,甚至提高到1.5%,最后筛选确定了诱导表达甲醇终浓度为合适的0.8%。

实验所用兔抗多克隆抗体是本实验室原核表达的IHNV衣壳蛋白^[6](已鉴定)纯化后免疫兔所得。经甲醇小量诱导表达的目的蛋白量随时间表达量的变化(如图5所示)在第6d达到最大值。表达产物经TCA

法浓缩沉淀后,采用ELISA法分析,表达产物能够与兔抗IHNV血清发生特异性反应。

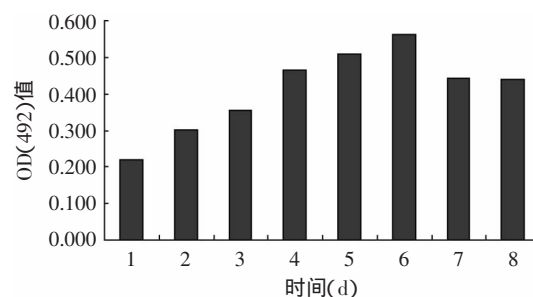


图5 重组酵母表达产物OD₄₉₂值时间变化曲线

Fig.5 OD₄₉₂ values variation with time of expressed proteins in recombinant

2.5 重组毕赤酵母大量表达产物的Western blot免疫印迹分析结果

将筛选出的阳性多拷贝子重组毕赤酵母经甲醇诱导大量表达,表达产物采用TCA浓缩法沉淀,透析后的上清液经His Trap亲和层析柱纯化,纯化后的目的蛋白用Western blot免疫印迹分析(结果如图6)。在40ku左右处有明显条带,与推导的目的蛋白大小一致。而阴性对照GS115-PIC9K在40ku左右处无条带,结果表明真核表达的蛋白可以与兔多抗血清发生反应,毕赤酵母GS115成功表达了目的基因。

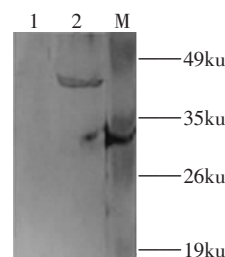


图6 纯化重组蛋白的Western blot分析

Fig.6 Western blot analysis of purified recombinant proteins
注: M为预染蛋白Marker; 1: 空载体毕赤酵母表达的蛋白; 2: 纯化的重组蛋白。

3 结论与讨论

*P.pastoris*真核表达系统不仅具有原核生物生长快、操作简便、成本低的特点,同时又具备哺乳动物细胞的翻译后加工和修饰的功能,可表达有生物活性的蛋白^[7],是比较成熟的真核表达系统。毕赤酵母表达外源蛋白有胞内表达和胞外分泌型表达两种方式^[8,10]。IHNV衣壳蛋白为糖基化蛋白,故本研究使用分泌型表达载体pPIC9K,这种载体含有Amp基因和Kan基因,能够很好的用于筛选标记。表达载体中的抗性基因对遗传霉素G418有抗性,改变遗传霉素G418的浓度可筛选出多拷贝转化子^[9,11-12]。本研究将PCR鉴定阳性的重组毕赤酵母接种于含遗传霉素G418的YPD平板上,通过浓度的不同来筛选出含有多拷贝子的重组毕赤酵母。同时该载体含有启动子AOX1基因,能够高效诱导外源基因表达^[9,13]。

在对IHNV衣壳蛋白进行原核表达的基础上,利用毕赤酵母表达系统对该蛋白进行真核表达。在

研究这两种表达的过程中发现真核表达有很多优于原核表达的方面:酵母细胞毒性较小,繁殖的速度很快,毕赤酵母表达系统的表达载体能整合外源基因于酵母核蛋白组中,最不同于原核表达系统的是,真核表达系统表达出的蛋白具有生物活性。本研究设计实验方案时倾向于采用Mut⁺型转化子,分泌表达载体选用pPIC9K,工程菌株选用GS115,重组蛋白进行胞外表达,实现了对虾IHHNV病毒衣壳蛋白在毕赤酵母中的高效表达。IHHNV在毕赤酵母中高效表达,为制备该病毒的检测试剂盒提供了必须的技术保障。试剂盒检测特异性高,简单快速,稳定易于操作,而且一次可以检测大批样品,对检测工作来说具有很大的应用前景。

参考文献

- [1] Lightner DV, Redman RM, Bell TA. Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp[J]. J Invertebrate Pathology, 1983, 42: 62-70.
- [2] Office International des Epizooties. Diagnostic manual for aquatic animal diseases[M]. Office International des Epizooties. Paris: FRANCE. 3rd ed, 2000: 253-266.
- [3] Mrozek G, Koesharyani. Fast short-fragment PCR for rapid and sensitive detection of shrimp viruses[J]. J Virol Meth, 2010, 168 (1-2): 262-266.
- [4] Teng PH, Lee PY, Lee FC, et al. Detection of infectious

- hy-podermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* by ramification amplification assay[J]. Dis Aquat Organ, 2006, 73(2): 103-111.
- [5] 吴昊,徐丽美,杨丰. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(福建株)基因组的克隆[J]. 台湾海峡, 2008, 27(2): 147-151.
- [6] 彭小莉,刘棠,谢明星,等. 对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒衣壳蛋白基因的克隆表达及抗体制备[J]. 台湾海峡, 2008, 27(1): 37-42.
- [7] 章如安,邱荣德,袁中一. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5): 371-373.
- [8] James M, Cregg, Joan Lin Cereghino, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. Molbiotechnol, 2000, 16: 23-52.
- [9] 谢涛,王红宁. 外源基因在巴斯德毕赤酵母中多拷贝整合的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 415-417.
- [10] 余祖华,王红宁. 利用巴斯德毕赤酵母表达外源蛋白的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(6): 614-616.
- [11] 王炎林,许崇波. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展[J]. 大连大学学报, 2006, 27(6): 67-71.
- [12] Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 102(1): 45-53.
- [13] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 45-66.

(上接第66页)

2008, 85: 42-50.

- [2] 丁筑红,杨咏鹃,刘坤,等. 不同干燥方法对辣椒品质的影响[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 57-60.
- [3] Ibrahim Doymaz, Mehmet Pala. Hot-air drying characteristics of red pepper[J]. Journal of Food Engineering, 2002, 55: 331-335.
- [4] None Y J. Development of a combined process of dehydration impregnation soaking and drying of bananas (*Musa acuminata* groupe *Cavendish*) [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 55 (3): 231-236.
- [5] 李慧. 渗透预处理樱桃番茄干燥特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [6] Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Niranjana K, et al. Recent developments in osmotic dehydration: Methods to enhance mass transfer[J]. Trends in Food Science & Technology, 2002(13): 48-59.
- [7] 韩晓岚,胡云峰,赵学志,等. 辣椒中辣椒红素提取工艺研究及其含量测定[J]. 中国食物与营养, 2010(10): 35-37.
- [8] 周丽,连运河,程远欣,等. HPLC法检测辣椒不同部位中辣椒碱和二氢辣椒碱的含量[J]. 中国食品添加剂, 2011(2): 231-234.
- [9] 桑林,王宏燕,江秀明. 超临界流体二氧化碳萃取辣椒籽油及其组成的研究[J]. 河南工业大学学报, 2008(3): 24-28.
- [10] Irena Perucka, Wieslaw Oleszek. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annum L.* by

- spectrophotometry and high-performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2000, 71: 287-291.
- [11] Ertekin F Kaymak. Drying and rehydrating kinetics of green and red peppers[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(1): 168-175.
- [12] Tunde-Akintunde T Y. Mathematical modeling of sun and solar drying of chilli pepper[J]. Renewable Energy, 2011: 2139-2145.
- [13] 杨咏鹃,丁筑红. 微波干燥辣椒色泽模型的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(12): 86-89.
- [14] 张建军,王海霞,马永昌,等. 辣椒热风干燥特性的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 298-301.
- [15] Chenlo F, Chaguri L, Santos F, et al. Osmotic dehydration/impregnation kinetics of Padron Pepper (*Capsicum annum L. Longum*) with sodium chloride solutions: Process modeling and colour analysis[J]. Food Science and Technology International, 2006(12): 221-227.
- [16] Uddin M B, Ainsworth Paul, Ibanoglu Senol. Evaluation of mass exchange during osmotic dehydration of carrots using response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 65: 473-477.
- [17] David C Yang, Le Maguer Marc. Mass transfer kinetics of osmotic dehydration of mushrooms[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1992, 16(3): 215-231.