

文章编号: 1000-0615(2003)05-0491-04

• 研究简报 •

白斑综合征病毒囊膜蛋白 *vp 28* 基因 在毕赤酵母中的表达

李 方, 叶巧真, 何建国, 王莉真
(中山大学生命科学学院生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

关键字: 白斑综合征病毒; 囊膜蛋白; 斑节对虾; 毕赤酵母

中图分类号: Q786; S917.1 文献标识码: A

Expression of the envelope protein gene *vp 28* of the white spot syndrome virus in *Pichia pastoris*

LI Fang, YE Qiao-zhen, HE Jian-guo, WANG Li-zhen
(State Key Laboratory of Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A pair of primers was designed based on the *vp 28* gene and PCR was performed to amplify the gene from WSSV DNA. Inserting the DNA fragment to the yeast-*E. coli* shuffle vector pPICZ and the recombinant plasmid (pPICZVP28) that contains the target DNA fragment was obtained in the *E. coli* strain. The pPICZVP28 was introduced into *Pichia pastoris* strain X33 by electroporation. The transformant strain X33-1 was grown in BMGY media in fled flask at 28 °C. Induced by methanol for 72h, the samples of cell pellets and supernatant were collected by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE and Western-blot, which confirmed that the strain X33-1 can express the WSSV's envelope protein *vp 28*.

Key words: white spot syndrome virus; envelope protein; *Penaeus monodon*; *Pichia pastoris*

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是危害东南亚及北美洲沿岸养殖对虾的重要病原。近十年来,国内外对该病毒的形态结构、基因组全序列、宿主范围、传播途径、致病性和组织细胞特异性等作了大量的研究^[1-7],并已确定该病毒的侵染与其囊膜蛋白 *vp 28* 有关^[8]。实验根据已发表的白斑综合征病毒囊膜蛋白 *vp 28* 基因序列^[9]设计一对引物,通过 PCR 扩增出该囊膜蛋白的基因片段。将该片段连接到毕赤酵母表达载体 pPICZ 上,在大肠杆菌中筛选到含目的基因的重组质粒 pPICZVP28,用电穿孔法将重组质粒转化到毕赤酵母菌株 X33 中,获得了转化子 X33-1。经 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析表明,在合适的培养条件下,转化子能表达出囊膜蛋白 *vp 28*。

收稿日期: 2002-09-05

资助项目: 国家自然科学基金项目(30000128), 科技部“973”环境胁迫对养殖生物抗病力的影响及人工调控项目(G1999012010), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2001AA621030)

作者简介: 李 方(1965-), 女, 湖南长沙人, 讲师, 主要从事水生动物疾病的研究

通讯作者: 何建国(1962-), 男, 广东南海人, 教授, 主要从事动物病害分子生物学研究。Tel: 020-84110976, E-mail: lsbc05@zsu.

edu. cn

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

毕赤酵母菌株(*Pichia pastoris*) X33、大肠杆菌菌株(*E. coli*) Top10及质粒 pPICZ 均由中山大学生物防治国家重点实验室王章教授赠送。

1.2 培养基

酵母菌的培养及培养基的配制按 Invitrogen 公司毕赤酵母表达系统使用手册(以下简称“手册”), YPD 培养基用于酵母菌的培养, YPDS+ Zeocin 培养基用于酵母转化子的筛选, BMGY 和 BMMY 培养基用于酵母菌转化子的诱导表达。LB 培养基用于 *E. coli* 菌株的保存和培养, LB+ Zeocin 培养基用于 *E. coli* 菌株转化子的筛选、保存和培养^[10]。

1.3 酶和其他生物学试剂

所使用的限制性内切酶、*Taq* 酶、T4DNA 连接酶均购自上海 Sangon 公司, 抗生素 Zeocin 购自 Invetrogen 公司。抗 WSSV 囊膜蛋白 *vp28* 兔抗血清由荷兰 Wageningen 大学 J. M. Vlak 教授赠送, 羊抗兔辣根过氧化物酶抗血清由华美公司购得。

1.4 表达载体质粒的构建与转化

根据 *vp28* 基因读码框两端的序列^[9]设计 1 对引物, 在引物两端分别引入限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 的识别位点, PCR 扩增目的基因 *vp28*。用 *EcoR* I 和 *Xba* I 对 *vp28* 基因片段和质粒 pPICZ 进行双酶切, 酶切片段亚克隆到表达载体 pPICZ 中, 然后转化到大肠杆菌 Top10 中, 筛选转化子, 提取重组载体质粒, 并对该重组载体质粒进行测序鉴定。PCR、酶切、连接和转化均按文献^[10]进行。

1.5 酵母菌转化

将重组载体质粒按文献^[10]中的标准方法, 用限制性内切酶 *Sac*I 线性化后, 用电穿孔法转化到毕赤酵母菌株 X33 中, 在 Zeocin 终浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 YPDS+ Zeocin 平板上筛选转化子。

1.6 酵母转化子的诱导表达

按手册中的方法进行。挑取转化子 X33-1 接种于 25mL BMGY 中, 于 250mL 三角瓶中 28°C $250\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 18h, 1500g 室温离心 5min, 弃上清, 将细胞重悬于 100mL BMMY 中, 于 500mL 三角瓶中, 28°C $250\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 每 24h 添加 0.5mL 甲醇诱导。培养 72h 后, 收集菌体及上清进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。另挑取转化子 X33-1 接种于 25mL YPD 培养基中(YPD 中的葡萄糖可完全抑制 pPICZ 质粒的表达), 于 250mL 三角瓶中 28°C , $250\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 18h, 1500g 室温离心 5min, 弃上清, 将细胞重悬于 100mL YPD 中, 于 500mL 三角瓶中 28°C 、 $250\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 培养 72h 后, 收集菌体及上清作为对照。

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

按手册对诱导表达 72h 的酵母细胞和上清进行处理, 然后按文献^[10]中的方法进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。

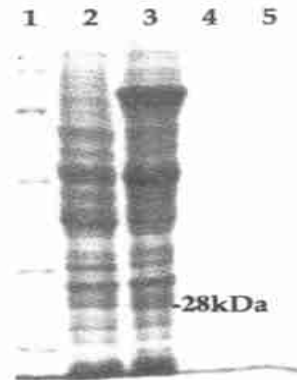


图1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the products of X33-1 fermentation

1: 蛋白 Marker; 2: 对照细胞沉淀; 3: X33-1 细胞沉淀;
4: X33-1 上清; 5: 对照上清

1. protein marker; 2. the control cell pellets; 3. X33-1 cell pellets;
4. supernatant of X33-1; 5. supernatant of the control

2 结果

2.1 WSSV 囊膜蛋白 *vp28* 基因重组质粒的构建

从 LB+ Zeocin 平板上随机筛选大肠杆菌转化子,提取质粒,经 PCR 鉴定,筛选到含目的基因的重组质粒 pPICZVP28 的阳性克隆。将重组质粒送上海基康公司进行测序,结果表明,WSSV 囊膜蛋白基因 *vp28* 的读码框(ORF)按设计正确插入载体质粒 pPICZ 中,且插入片段无碱基错误。

2.2 WSSV 囊膜蛋白基因 *vp28* 在毕赤酵母转化子中的表达

将重组质粒 pPICZVP28 用限制性内切酶 *SacI* 线性化后,用电穿孔法转化到毕赤酵母菌株 X33 中,从 YPD+ Zeocin 平板上获得了转化子 X33-1。转化子 X33-1 诱导表达 72h,离心收集菌体和上清,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。

SDS-PAGE 的结果表明,在 BMMY 中诱导表达的酵母转化子 X33-1 的细胞样品在分子量约 28kDa 处有一明显的蛋白带,而对照则没有(图 1)。从图 1 中还可看到菌体分泌到培养液上清中的蛋白是很少的,在凝胶中几乎看不到蛋白带。Western-blot 检测结果表明,对照的细胞和上清都没有任何特异带显示;诱导表达的酵母转化子 X33-1 的细胞中分子量约 28kDa 和 43kDa 处的蛋白都能与 *vp28* 的抗血清产生强烈的特异性反应而在转印的硝酸纤维素膜上显示出很浓的深黑褐色条带,上清仅在分子量约 28kDa 处有稍浅的黑褐色特异带(图 2)。将蛋白凝胶扫描测量蛋白含量,28kDa 这条带蛋白含量占总可溶性蛋白含量的 6.9%,43kDa 这条带蛋白含量占可溶性蛋白含量的 22.8%。

3 讨论

WSSV 主要是靠对虾摄食带病毒宿主而传播的。这一传播特点与该病毒的囊膜有很大的关系。无囊膜的 WSSV 核衣壳不具备感染性^[1],具完整囊膜的 WSSV 病毒体,若其囊膜蛋白 *vp28* 被抗 *vp28* 的免抗血清中和,则也失去感染性,因此,囊膜蛋白 *vp28* 在 WSSV 的侵染中起着重要的作用^[8]。Vlak 等人曾用杆状病毒表达系统表达出了 *vp28*^[9]。与杆状病毒表达系统相比,毕赤酵母表达系统有廉价、高效、简便、无毒等特点^[11,12],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的囊膜蛋白,以获得大量纯化的表达产物作为免疫抗原或做其他研究^[13-17]。本文表达的重组 *vp28* 蛋白具有与抗 WSSV 囊膜蛋白 *vp28* 抗体产生特异免疫反应的能力,为深入研究该蛋白的性质和作用打下了基础。

酵母表达基因工程产物常具有不均一性。本文中毕赤酵母转化子 X33-1 发酵产物在 Western-blot 分析中,在分子量

约 28kDa 和 43kDa 处都有特异带,这一现象在用该系统表达 HIV 的囊膜蛋白 gp120 时也有发生^[17]。本文中出现的多特异带用糖原内切酶 endoglycosidase H(Endo H) 处理后,证明这确实是因为表达产物的超糖基化修饰(hyperglycosylation)和信号肽未被切除所致。多个免疫活性蛋白现象的成因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] He J G, Zhou H M, Yao B, et al. White spot syndrome baculovirus (WSSV) host range and transmission route[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1999, 38(2): 65-69. [何建国,周化民,姚泊,等.白斑综合征杆状病毒(WSBV)的宿主范围和传播途径的研究[J].中山大学学报,1999,38(2):65-69.]
- [2] Rajendran K V, Vijayan K K, Santiago T C, et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, pawn crabs and lobsters from India [J]. Fish Diseases, 1999, 22: 183-191.
- [3] Lo C F, Ho C H, Peng S R, et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. Diseases of Aquatic Organism, 1996, 29: 215-225.

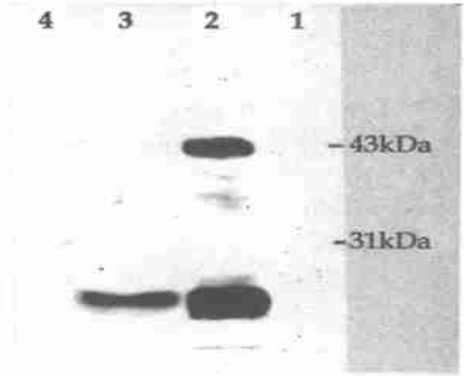


图 2 Western-blot 结果

Fig. 2 Western-blot analysis of the products of the induced Fermentation

1. 对照细胞沉淀; 2. X33-1 细胞沉淀; 3. X33-1 上清; 4. 对照上清
1. cell pellets of the control; 2. cell pellets of X33-1; 3. supernatant of X33-1; 4. supernatant of control

- [4] Flegel T W. A turning point for sustainable aquaculture: the white spot virus crisis in Asian shrimp culture [J]. *Aquaculture Asia*, 1996, 1: 29–34.
- [5] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. *Diseases of Aquatic Organism*, 1995, 21: 69–77.
- [6] Indrani Karunasagar, Ota S K, Iddya Karunasagar. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India [J]. *Aquac*, 1997, 153: 9–13.
- [7] He J G, Deng M, Long Q X, et al. Theory and strategies for controlling white spot syndrome (WSS) of cultured *Penaeus monodon* in south China [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2000(Suppl.), 39: 147–153. [何建国, 邓敏, 龙紫新, 等. 南中国斑节对虾养殖中控制白斑综合症病的理论和策略 [J]. *中山大学学报*, 2000, 39(增刊): 147–153.]
- [8] Marielle C W, van Hulten, Witteveldt J, et al. The white spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the infection of shrimp [J]. *Virology*, 2001, 285: 228–233.
- [9] Marielle C W, van Hulten, Marcel W, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. *Virology*, 2000, 266: 227–236.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed) [M]. Beijing: Science Press, 1992. [金冬雁译. *分子克隆实验指南* (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.]
- [11] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review [J]. *Yeast*, 1992, 8: 423–488.
- [12] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 905–910.
- [13] Cregg J M, Tshopp J F, Stillman C, et al. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Bio/Technology*, 1987, 5: 479–485.
- [14] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biochemistry*, 1989, 28: 4117–4125.
- [15] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies [J]. *Gene*, 1991, 105: 205–212.
- [16] Romanos M A, Clare J J, Beesley K M, et al. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 1461–1467.
- [17] Carol A S, Richard G B, Jeffrey J C, et al. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1993, 136: 111–119.