

# 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP28 和 VP26 的毕赤酵母组成型分泌表达\*

耿小雪 王小霞 周怡 徐玮 张文兵<sup>①</sup> 麦康森

(水产动物营养与饲料农业部重点实验室 海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**摘要** 近年来,重组 VP28 和 VP26 蛋白作为蛋白亚单位疫苗,在增强对虾抗白斑综合征病毒(WSSV)感染的过程中具有重要作用。本研究根据 GenBank 中 WSSV 的基因序列设计引物,以 WSSV 粗提液为模板进行普通 PCR 扩增,得到 VP28 和 VP26 基因,再用引物悬挂法将 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点分别添加到 VP28 和 VP26 基因的 5'端和 3'端。目的基因经双酶切后插入到表达载体 pGAPZαA,转化 TOP10 大肠杆菌,经博莱霉素(Zeocin)抗性筛选阳性重组酵母表达载体。*Avr* II 酶切线性化之后,电击转化 X-33 毕赤酵母感受态细胞,经 Zeocin 抗性筛选得到阳性重组酵母。SDS-PAGE 电泳分析重组酵母表达上清液的目的蛋白,没有检测到 VP28 和 VP26 重组蛋白。随后,采用蛋白质银染法,结果显示,与空载 pGAPZαA 组相比,VP28 和 VP26 表达上清液组有明显的条带,证明 VP28 和 VP26 在毕赤酵母中成功表达,蛋白分子量大小约为 32 kDa。

**关键词** 白斑综合征病毒; VP28; VP26; 重组表达; 毕赤酵母

**中图分类号** S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0135-05

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)严重危害着全球对虾养殖业,造成巨大的经济损失。WSSV 致病宿主范围非常广,致病力也非常强,对虾感染该病毒后死亡率高达 100%。然而, WSSV 全基因组序列测序的完成,使研究者对 WSSV 的结构基因及其表达的蛋白的性质和功能有了全面的认识(陈文博等, 2009)。运用蛋白质组学的方法,已经鉴别出 40 多种 WSSV 的结构蛋白,其中 22 种是囊膜蛋白,主要的囊膜蛋白有 VP19、VP28、VP31、VP36B、VP38A、VP51B 和 VP53A 等,主要的囊膜被膜蛋白有 VP26、VP36A、VP39A 和 VP95 等(Tsai *et al*, 2006; Leu *et al*, 2009)。通过免疫共沉淀法和酵母双杂交法研究了 WSSV 结构蛋白之间的互相作用,发现 VP28、VP51A、VP19 和 VP37 这 4 种蛋白位于病毒颗粒的最外层,预测它们可能在识别宿主细胞表面的模式、识别受体方面具有重要的作用(Chang *et al*,

2010)。Yi 等(2004)研究发现, VP28 是 WSSV 侵入对虾细胞所必需的,而 VP26 负责将 VP28 蛋白与核壳蛋白连接起来(Wan *et al*, 2008)。

一般认为,对虾缺乏获得性免疫系统,只能依赖天然性免疫系统来抵抗外源病原体的入侵。然而,现在越来越多的研究发现,DNA 疫苗(Rajeshkumar *et al*, 2009; Mu *et al*, 2012)和蛋白质亚单位疫苗(丁晶等, 2013; Satoh *et al*, 2008)可以激活对虾的免疫系统、增强对虾抵抗病毒侵染的能力,这些研究颠覆了人们对对虾免疫认识的传统思维,为寻求防治 WSSV 的有效途径带来了希望。DNA 疫苗是在分子生物学技术基础上发展起来的特殊疫苗,它具有免疫效果好、生产成本低和临床应用方便等优点(杨海等, 2013)。但 DNA 疫苗的本质毕竟是核酸,存在着基因转移到宿主的可能性,其使用的安全性必须放在最关键的位置。蛋白质亚单位疫苗的本质是蛋白质,生物体利用

\* 国家公益性行业(农业)专项经费项目(201103034)资助。耿小雪, E-mail: gengxue2013@163.com

① 通讯作者: 张文兵, 教授, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-05-22, 收修改稿日期: 2015-05-26

蛋白质并将其用于机体本身的生命活动,不会造成危害,是一种安全的疫苗。

本研究选取 VP28 和 VP26 这两种 WSSV 囊膜蛋白作为研究对象,利用毕赤酵母表达系统来组成分泌表达这两种目的蛋白,以期为规模化制备对虾免疫增强剂提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 质粒与菌种** 表达质粒 pGAPZ $\alpha$ A 和 X-33 毕赤酵母(Invitrogen)为本实验室-80℃保存。*E.coli* Competent Cells Top10 购自北京天根生物科技有限公司。WSSV 粗提液为本实验室-80℃保存。

**1.1.2 实验试剂** pEASY-T1 simple Cloning Kit 和 T4 DNA Ligase 购于北京全式金生物技术有限公司; Zeocin 购自 Invitrogen 公司; 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2 kb/5 kb DNA Marker、高纯度质粒小提试剂盒、常规 PCR 用 2×Es Taq MasterMix 和蛋白银染试剂盒购自康为世纪生物公司(CWBIO, 北京); 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I 和 *Avr* II 购于 TaKaRa 公司; 葡萄糖为 AMRESCO 公司产品; 酵母提取物(Yeast Extract)、胰蛋白胨(Tryptone)和琼脂粉均购于 BBI 公司, 其他均为国药分析纯。

**1.1.3 引物设计** 根据 NCBI 中提交的 WSSV 的全基因组 cDNA 序列(GenBank: AF332093.3), 设计含 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点的 VP28 基因引物 xVP28-F、xVP28-R, VP26 基因引物 xVP26-F、xVP26-R。根据 Invitrogen 公司 pGAPZ $\alpha$ A 手册提供的引物序列 pGAP-F、AOX1-R, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, xVP28-F(5'-3'): CCGGAATTC-ATGGATCTTTCTTTCAC, xVP28-R(5'-3'): GCTCTAG-ATTACTCGGTCTCAGTGC。xVP26-F(5'-3'): CCGGA-ATTCATGGAATTTGGCAACC, xVP26-R(5'-3'): GCTCTAGATTACTTCTTCTTGATTTTCG。pGAP-F(5'-3'): GTCCCTATTCAATCAATTGAA, AOX1-R(5'-3'): GCAAAATGGC ATTCTGACATCC。引物中加下划线部分序列分别为 *EcoR* I、*Xba* I 酶切识别位点, 且在酶切位点前引入了保护碱基。

### 1.2 方 法

**1.2.1 VP28 和 VP26 基因的获得** 取-80℃保存的 WSSV 粗提液作为模板, 以引物对 xVP28-F/xVP28-R 和 xVP26-F/xVP26-R 分别进行普通 PCR 扩增, 反应体积为 50  $\mu$ l, 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃

变性 30 s, 62℃/58℃退火 30 s(VP28/VP26), 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。采用快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 VP28 和 VP26 目的片段。

### 1.2.2 pGAPZ $\alpha$ A 目的基因重组表达载体的构建

使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 对空载 pGAPZ $\alpha$ A、VP28 和 VP26 基因进行双酶切, 切胶回收后 T4 连接酶于 25℃连接 30 min。转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 在含 25  $\mu$ g/ml Zeocin LB 平板上进行抗性筛选, 挑取阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序正确的重组表达质粒分别命名为 pGAPZ $\alpha$ A、pGAPZ $\alpha$ A-VP28 和 pGAPZ $\alpha$ A-VP26。

**1.2.3 重组表达质粒电转化毕赤酵母** 使用 *Avr* II 酶切线性化重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A、pGAPZ $\alpha$ A-VP28 和 pGAPZ $\alpha$ A-VP26。参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册制备 X-33 酵母感受态细胞。将线性化质粒电击转化 X-33 酵母, 然后涂布于含 100  $\mu$ g/ml Zeocin YPDS 平板上, 30℃培养 3 d 左右, 筛选阳性克隆。提取阳性酵母基因组 DNA 作为模板, 以 pGAP-F 和 AOX1-R 作为上下游引物进行普通 PCR 扩增, 阳性重组酵母分别为 X-33/pGAPZ $\alpha$ A-VP28 和 X-33/pGAPZ $\alpha$ A-VP26, X-33/pGAPZ $\alpha$ A 作为空白对照。

**1.2.4 重组酵母的表达与检测** 挑取阳性重组酵母分别接种至 5 ml Zeocin 抗性的 YPD 液体培养基中, 在 30℃、250 r/min 的条件下过夜培养。取 200  $\mu$ l 上述活化菌液接种至装有 50 ml 新鲜 YPD 培养基的 250 ml 三角摇瓶中, 30℃、250 r/min 振荡培养 72 h。4℃、12000 $\times$ g 离心 3 min, 上清液经液氮速冻后, 保存于-80℃冰箱。

分别取 40  $\mu$ l X-33/pGAPZ $\alpha$ A-VP28、X-33/pGAPZ $\alpha$ A-VP26 和 X-33/pGAPZ $\alpha$ A 蛋白发酵上清液, 加入 10  $\mu$ l 5 $\times$ 蛋白质上样缓冲液, 混匀后, 99℃金属浴 10 min, 然后 12000 $\times$ g 离心 2 min, 取离心后的上清液上样, 取 5  $\mu$ l 蛋白质分子量标准作为分子量参照, 进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。电泳结束后, 分别采用 R-250 考马斯亮蓝染色和蛋白质银染来检测目的蛋白。

## 2 结 果

### 2.1 VP28 和 VP26 基因的扩增

VP28 和 VP26 的基因是以 WSSV 的 DNA 粗提液为模板, 进行普通 PCR 扩增得到的, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 在 500-750 bp 之间有明显的条带, 这与预测的 VP28 和 VP26 基因的片段大小均为 632 bp 相符。

### 2.2 pGAPZ $\alpha$ A-VP28 和 pGAPZ $\alpha$ A-VP26 重组质粒的鉴定

用 T4 DNA Ligase 将酶切后的片段与具有相同黏

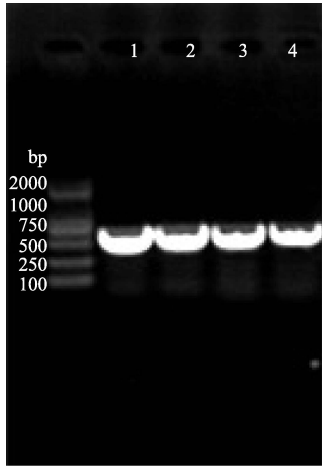


图 1 VP28 和 VP26 PCR 扩增结果  
Fig.1 PCR amplification of VP28 and VP26 gene

1-2: VP28; 3-4: VP26

性末端的 pGAPZaA 表达载体连接, 从而构建好重组表达载体, 将得到的连接产物转化大肠杆菌 Top10, 经 Zeocin 抗性筛选后, 挑取抗性单克隆进行菌落 PCR 鉴定, PCR 产物电泳结果见图 2, 与目的条带应为 1172 bp 的理论值相符。取阳性克隆测序, 测序结果经 MEGA 5.05 软件分析, 可证明重组表达载体序列完全正确, 无移码错配。

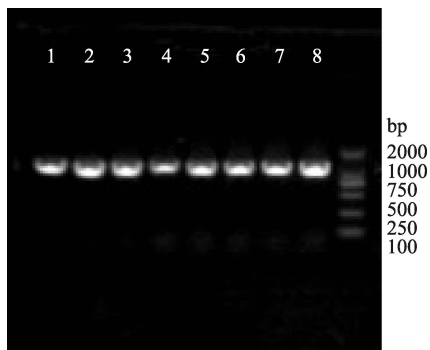


图 2 重组质粒菌落 PCR  
Fig.2 PCR identification of the recombinant plasmid

1-4: pGAPZaA-VP28; 5-8: pGAPZaA-VP26

### 2.3 重组酵母发酵上清液 SDS-PAGE 电泳考染结果

挑取阳性酵母转化子进行发酵, 发酵上清液用于蛋白质凝胶电泳, 电泳结束后采用考马斯亮蓝 R-250 染色, 染色结果见图 3, 结果显示, 与空载 pGAPZaA 相比, 含有 VP28 和 VP26 目的基因的酵母上清液电泳没有特异的条带。因此, 需要采用更灵敏的检测方法来确定目的蛋白是否成功表达。

### 2.4 重组酵母发酵上清液 SDS-PAGE 电泳银染结果

利用蛋白质银染法来进一步检测酵母发酵上清液

中的目的蛋白, 银染结果见图 4, 与空载 pGAPZaA 酵母表达上清液组相比, pGAPZaA-VP28 和 pGAPZaA-VP26 酵母表达上清液组在箭头所指的平行位置有明显的特异性条带。根据蛋白分子量标准预测 VP28 和 VP26 的蛋白分子量在 32 kDa 左右。

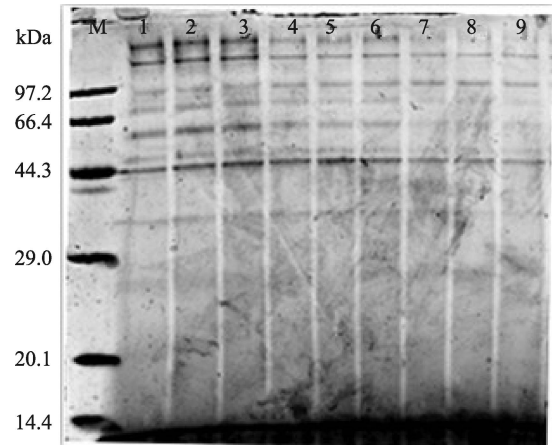


图 3 VP28、VP26 和空载重组酵母 SDS-PAGE 电泳考染结果  
Fig.3 SDS-PAGE analysis (R-250 staining) of the VP28 and VP26 recombinant protein expressed in X-33

1-3: X-33/pGAPZaA-VP28; 4-6: X-33/pGAPZaA-VP26; 7-9: X-33/pGAPZaA

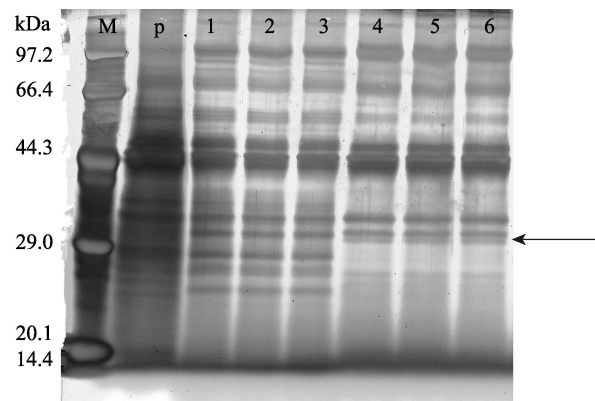


图 4 重组酵母 SDS-PAGE 电泳银染结果  
Fig.4 SDS-PAGE analysis (silver staining) of the VP28 and VP26 recombinant protein expressed in X-33

P: X-33/pGAPZaA; 1-3: X-33/pGAPZaA-VP28; 4-6: X-33/pGAPZaA-VP26

## 3 讨论

随着基因工程和生物技术的发展, 在体外表达功能蛋白已经成为一种高效可行的获取蛋白疫苗的方法。在对虾白斑综合征防治的研究中, WSSV 重组蛋白可以诱发虾体产生抗 WSSV 侵染反应的结果已被许多研究者所证明, 而这些 WSSV 重组蛋白被称为

蛋白质亚单位疫苗,其中研究最多的是 VP28 病毒囊膜蛋白。魏克强等(2005)利用杆状病毒感染家蚕蛹来成功表达 VP28 蛋白, Fu 等(2008)构建了 pBS-H1-VP28 枯草芽孢杆菌表达载体,并在枯草芽孢杆菌成功表达 VP28 蛋白, Satoh 等(2008)利用大肠杆菌成功表达了 VP28 和 VP26 蛋白,养殖实验均证明 WSSV 重组蛋白具有增强虾体抗 WSSV 感染的能力。

本研究使用毕赤酵母表达系统分泌性表达 VP28 和 VP26 目的蛋白,选用的表达载体是 pGAPZaA,它属于组成型的表达载体,因为该表达载体的启动子是 pGAP(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子),使用该启动子表达目的蛋白时不需要使用甲醇诱导。毕赤酵母表达系统属于真核表达系统,对翻译后的蛋白质可以进行一定的加工,有利于真核生物蛋白的表达和活性的保持,优于原核表达系统。此外,表达产物可以分泌到细胞外,便于目的蛋白的纯化与分离,适合规模化生产。目前,利用该表达系统已经成功表达很多功能蛋白,如  $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、羧肽酶 B 和羧酸酯酶等(Waterham *et al*, 1997; Sears *et al*, 1998; 张平涛, 2008<sup>1)</sup>; Delroisse *et al*, 2005)。使用组成型表达系统不需要更换碳源,发酵周期短,且可以采用连续发酵的方式进行大规模发酵,这些都给酵母发酵产业带来了新的视角和机遇。但是,使用毕赤酵母组成型表达系统外源蛋白时,有一个最主要的限制,就是本系统不能用于表达对酵母细胞有害的蛋白质。此外,毕赤酵母组成型表达系统能否高效分泌性表达外源蛋白,还与目的基因插入酵母基因组的位置与拷贝数、选用何种信号肽序列以及酵母培养条件(如温度、pH 值、溶氧和营养物等)等有密切关系。

本研究首次尝试在毕赤酵母中组成型分泌表达 VP28 和 VP26 目的蛋白,经检测成功表达,但目的蛋白的表达量较低,推测有以下原因:(1)发酵条件不合适:实验采用摇瓶小量发酵,无法控制发酵液的 pH 值、溶氧量以及营养物质的供给;(2)没有筛选到高效表达的菌株:目的基因不同拷贝数的插入,甚至不同的阳性菌株,目的蛋白的表达量都有可能不同,实验缺乏有效的检测高效表达菌株的方法;(3)信号肽选用不合适:本研究采用的是酵母本身的信号肽序列— $\alpha$ -交换因子,该信号肽可能不适合引导 VP28 和 VP26 分泌表达;(4)VP28 和 VP26 蛋白本身可能不适合在毕赤酵母中组成型分泌表达。因此,还需要大量相关的研究来解释这一现象的真实原因。尽管如此,

本研究还是能为研究 WSSV 蛋白亚单位疫苗的研究提供实践经验和基础数据,为 WSSV 蛋白亚单位疫苗的规模化使用的前景奠定一些基础。

## 参 考 文 献

- 丁晶, 彦波, 傅玲琳. 以枯草芽孢杆菌递呈 VP28 对南美白对虾免疫相关基因表达和细胞特异性吞噬的影响. 水生生物学报, 2013, 37(4): 705-711
- 陈文博, 侯林, 刘庆慧. 对虾白斑综合征病毒亚单位疫苗研究进展. 动物医学进展, 2009, 29(12): 73-76
- 杨海, 王芳宇. DNA 疫苗的研究进展. 中国畜牧兽医, 2013, 40(1): 72-76
- 魏克强, 许梓荣. 家蚕蛹表达的重组 VP28 疫苗对克氏原螯虾的抗病毒保护效应. 实验生物学报, 2005, 38(3): 190-198
- Chang YS, Liu WJ, Lee CC, *et al*. A 3D model of the membrane protein complex formed by the white spot syndrome virus structural proteins. PLoS One, 2010, 5(5): e10718
- Delroisse JM, Dannau M, Gilsoul JJ, *et al*. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. Protein Express Purif, 2005, 42(2): 286-294
- Fu LL, Li WF, Du HH, *et al*. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. Lett Appl Microbiol, 2008, 46(5): 581-586
- Leu JH, Yang F, Zhang X, *et al*. Whispovirus/Lesser Known Large dsDNA Viruses. Springer Berlin Heidelberg, 2009: 197-227
- Mu Y, Lan JF, Zhang XW, *et al*. A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. Dev Comp Immunol, 2012, 36(2): 442-449
- Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M, *et al*. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 429-437
- Satoh J, Nishizawa T, Yoshimizu M. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. Dis Aquat Organ, 2008, 82(2): 89-96
- Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, *et al*. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast, 1998, 14(8): 783-790
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al*. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. J Virol, 2006, 80(6): 3021-3029
- Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus

1) 张平涛. 鼠羧肽酶原 B 和蛇毒金属蛋白酶 Alfimeprase 两种蛋白在毕赤酵母中表达研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2008

functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *J Virol*, 2008, 82(24): 12598–12601

Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, *et al.* Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186: 37–44

(编辑 冯小花)

## Secretive Expression of White Spot Syndrome Virus Envelope Proteins VP28 and VP26 in *Pichia pastoris* Induced by Constitutive Promoter

GENG Xiaoxue, WANG Xiaoxia, ZHOU Yi, XU Wei, ZHANG Wenbing<sup>①</sup>, MAI Kangsen

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** WSSV has been a globally recognized highly harmful pathogen in shrimp farming industry that causes tremendous economic loss. The envelope proteins of WSSV, VP28 and VP26, play important roles in interacting with host cells, initiating virus infection and mediating virus intrusion. In this study, we used pGAPZαA as the expression vector and X-33 *Pichia pastoris* as the host cell to express VP28 and VP26 in a secretive manner. The coding sequences of VP28 and VP26 (GenBank: AF332093.3) were amplified from WSSV using PCR, and the sequences of *EcoR* I (GAATTC) and *Xba* I (TCTAGA) were added to the 5' and 3' ends of the target genes. The purified PCR products were then cloned into the *EcoR* I/*Xba* I sites of the pGAPZαA vector. Sequencing analysis verified whether the target genes were correctly inserted into the reading frame. The construct was linearized by *Bln* I (*Avr* II) and then was integrated into *P. pastoris* X-33 through electroporation while being screened by Zeocin. The expressed proteins were identified with SDS-PAGE. The VP28 and VP26 recombinant proteins could not be detected by coomassie brilliant blue R250 staining, however, the bands of the fusion proteins appeared after silver staining. The sizes of VP28 and VP26 fusion proteins were about 32 kDa. These results suggest that the *P. pastoris* system was effective in expressing WSSV envelope proteins VP28 and VP26, although the expression level was not sufficient. Nonetheless, our study still established a novel tool for the study of subunit vaccine, and provided basic information for the large scale vaccine production.

**Key words** White spot syndrome virus; VP28; VP26; Recombinant expression; *Pichia pastoris*

① Corresponding author: ZHANG Wenbing, E-mail: wzhang@ouc.edu.cn