

文章编号: 1000-0615(2016)03-0388-08

DOI: 10.11964/jfc.20151110139

传染性造血器官坏死病病毒参考蛋白的研制

王树云¹, 高志强¹, 张旻², 谷强¹, 任彤¹,
刘艳华¹, 江育林², 张利峰^{1*}

(1. 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026;

2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘要: 为规避活病毒作参考物质存在的生物安全风险, 本研究利用毕赤酵母表达系统表达了传染性造血器官坏死病病毒(IHNV)的糖蛋白来制备参考蛋白, 作为IHNV免疫学检测参考物质。本研究选用IHNV糖蛋白基因(IHNV-G)为目的基因, 根据GenBank中IHNV全基因序列设计特异性引物, 以IHNV-uk株病毒核酸为模板, 通过RT-PCR获得糖蛋白基因片段, 将其克隆至真核表达载体pPICZ α A, 转入毕赤酵母感受态细胞GS115中, 使外源基因与酵母基因融合, 通过1%甲醇诱导表达外源蛋白, SDS-PAGE分析显示获得可溶性表达蛋白, 分子量大于70 ku。经Western Blot和ELISA分析, 该表达产物可以被IHNV多抗特异性识别。0.1531 mg的重组蛋白与0.3125TCID₅₀ IHNV在ELISA实验中反应原性相当, -20 °C可稳定保存2个月, 说明其在一定程度上可替代病毒作为参考物质。该研究为IHNV ELISA检测试剂盒的开发奠定基础。

关键词: 传染性造血器官坏死病病毒; 参考蛋白; 毕赤酵母

中图分类号: Q 511; S 917.1

文献标志码: A

传染性造血器官坏死病(infectious haematopoietic necrosis, IHN)是一种鱼类急性、全身性传染病, 主要危害鲑(*Oncorhynchus spp.*)、鳟(*Salmo trutta*)鱼类鱼苗和幼鱼的健康生长, 制约各地冷水鲑、鳟鱼类养殖业的发展^[1]。有研究指出, IHN的暴发曾造成虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)成鱼死亡率达到10%~25%, 鱼苗死亡率100%^[2]。IHN被世界动物卫生组织(OIE)列为必须申报的动物疫病, 在我国属于二类疫病^[3]。

传染性造血器官坏死病病毒(infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)是传染性造血器官坏死病的病原, 隶属于弹状病毒科(Rhabdoviridae), 诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)^[4]。IHNV基因组为单股、负链RNA, 全长约11kb, 包含6个基因, 从3'-5'端依次为N-P(M₁)-M₂-G-NV-L, 分别编码病毒核蛋白

(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)、聚合酶蛋白(L)和非结构蛋白(NV)^[5]。糖蛋白是IHNV的外壳囊膜突起的重要组成部分, 是主要抗原蛋白, 内部存在较多的抗原表位^[6]。糖蛋白与病毒的毒力有重要的关系^[7-8], 参与病毒与细胞的识别和结合过程, 在一定程度上可以代替全病毒制备多抗作免疫和诊断方面的研究^[9]。

本课题组曾利用大肠杆菌表达系统成功表达IHNV-G糖蛋白, 但产物以包涵体形式存在, 变性、复性等步骤繁琐, 纯化困难。这与其他研究者结论相符, 朱旭等^[9]在建立快速有效的检测IHNV的免疫学方法时, 利用大肠杆菌发酵生产病毒糖蛋白, 只获得包涵体糖蛋白; 郑怀东等^[10]建立现场胶体金试纸条快速诊断方法时, 构建重组表达质粒pET-30a-IHNV-G转化至大肠杆菌BL21DE3plySs中, IPTG诱导表达, 得到的同样是

收稿日期: 2015-11-02 修回日期: 2015-12-09

资助项目: 质检公益性项目(201310221)

通信作者: 张利峰, E-mail: zlf1973@163.com

包涵体糖蛋白。毕赤酵母表达系统易于高密度发酵, 可对表达蛋白进行糖基化修饰, 使得表达蛋白更接近天然蛋白活性, 且其本身分泌表达的蛋白很少, 已被广泛应用于表达病毒囊膜蛋白或糖蛋白^[11-13]。分泌型表达载体pPICZaA序列中含有 α 因子信号肽序列, 可使目的蛋白实现胞外分泌表达进入上清, 序列表达蛋白却在分泌过程中被酵母细胞自身的蛋白酶切除, 便于目的蛋白分离纯化^[13]。

随着水产疫病国家标准的逐步推广应用, 以及新型检测方法研究的不断展开, 对参考物质的需求也越来越急迫。用活病毒作为参考物质存在生物安全风险, 利用基因工程表达蛋白代替病毒作为参考物质受到重视。本研究选取传染性造血器官坏死病病毒的糖蛋白基因(IHNV-G), 通过分泌型表达载体将目的基因融入毕赤酵母细胞母体基因, 利用甲醇诱导表达糖蛋白片段制备抗原蛋白, 以期在血清学检测中能够替代病毒作参考物质。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞、毒株、菌株 IHNV标准株(IHNV-uk)由北京出入境检验检疫局技术中心引进保存, pPICZaA载体, 酵母细胞GS115为本实验室保存; 大肠杆菌*E.coli* Top10购自北京天根生物科技有限公司。

培养基 重组表达载体构建及基因融合至融合酵母基因表达过程中用到的培养基包括低盐LB、YPD、YPDS、BMGY及BMMY, 均按照Invitrogen公司的Easy Select Pichia Expression Kit使用手册中方法进行配制和保存^[13]。其中LB、YPD及YPDS用于重组克隆子的培养和筛选, BMGY和BMMY用于阳性融合菌的诱导表达。

引物根据GenBank中已公布的IHNV全基因序列(No:L40883.1), 设计针对IHNV糖蛋白基因(IHNV-G)的特异性引物G1和G2, 并在该特异性上、下游引物的5'端分别引入KpnI和NotI酶切位点(表1)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 同时合成真核表达通用引物5'AOXI和3'AOXI, 用于重组质粒的鉴定。

其他主要试剂及耗材 病毒核酸抽提试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒、限制性内切酶KpnI、NotI和SacI, T4 DNA连接酶、DNA片段纯化试剂盒以及酵母DNA提取试剂盒均为TAKARA产品, 购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒大提试剂盒和DL2000 DNA Marker购自北京天根生物科技有限公司。protein ladder及预染蛋白Marker购自NEB。酵母感受态细胞制备试剂盒及博来霉素ZeocinTM为Invitrogen产品。IHNV多抗由中国检验检疫科学研究院江育林教授提供, 效价为1:20 000, HRP标记的兔抗山羊酶标二抗以及山羊阴性血清购自北京中杉金桥生物有限公司。蛋白浓缩管为Amersco产品。

1.2 方法

构建真核表达质粒 病毒核酸抽提及目的基因片段的扩增参照试剂盒说明书进行, 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 与理论值相符且无非特异性扩增杂带, 用DNA片段纯化试剂盒纯化, -20 °C存放备用。

纯化回收的扩增产物IHNV-G片段用限制性内切酶KpnI和NotI消化处理, 以同样方式消化处理表达质粒载体pPICZaA, 酶及DNA片段的取用量参照酶使用说明书, 消化产物均需用DNA片段纯化试剂盒纯化回收。2种消化回收产物利用T4 DNA连接酶于16 °C连接过夜并转化至大肠杆菌*E.coli* Top10, 通过含有ZeocinTM(25 μ g/mL)的低

表 1 PCR引物

Tab. 1 PCR primers

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence(5'~3')	扩增长度/bp amplification size
G1	ACTGGTACCATGGACACCATGATCACCCTC (KpnI)	1527
G2	GTCGCGGCCGCCCGTTTCCAGGTGATA (NotI)	
5'AOXI	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	2200
3'AOXI	GCAAATGGCATTCTGACATCC	

注: 斜体划线部分为酶切位点

Notes: Italics underlined portion is enzyme loci

盐LB平板筛选重组质粒,挑取平板上的单克隆菌落通过特异性引物PCR鉴定(PCR扩增程序为94 °C/2min; 94 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/3min, 30个循环; 72 °C/8min; 4 °C保温)。PCR初步鉴定为阳性的重组质粒(pPICZa-IHNV-G)继续进行双酶切鉴定,选用30 μL双酶切体系,酶及DNA片段的取用量参照酶使用说明书。同时取20 μL质粒DNA送上海生工测序。

糖蛋白基因与酵母基因的融合 大量提取阳性重组质粒pPICZa-IHNV-G,利用限制性内切酶SacI酶切线性化后通过化学方法转入毕赤酵母GS115感受态细胞,涂布含有Zeocin™(100 μg/mL)的YPDS平板,于30 °C培养5 d筛选融合酵母菌落。挑取平板上的单菌落接入含有Zeocin™(100 μg/mL)的YPDS液体培养基中于30 °C培养过夜增菌,利用宝生物工程(大连)有限公司的酵母质粒提取试剂盒提取融合酵母菌液DNA,取1 μL做模版,选用25 μL扩增体系,分别用5' AOX1、3' AOX1酵母通用引物和G1、G2特异性引物进行PCR鉴定(扩增程序为:94 °C/2 min; 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/3 min, 30个循环; 72 °C/8 min; 4 °C保温)。

糖蛋白基因的诱导表达及分析鉴定 挑取阳性融合株单克隆菌落接入50 mL BMGY培养基(置于500 mL锥形瓶),置于29 °C温箱内以260 r/min摇瓶培养18 h至OD₆₀₀=2~6,1500 g离心收集细胞后重悬于25 mL BMMY培养基中(置于250 mL锥形瓶中),添加甲醇使其终浓度为1%,于相同条件下摇瓶,并每过24 h添加一次甲醇至相同浓度,在诱导的第0、24、72、120 h分别取样1 mL,于4 °C、8000 × g离心5 min,分离上清液和沉淀,-80 °C冰箱保存备用,诱导表达结束,其他剩余样离心分离上清和沉淀保存于-80 °C备用。取80 μL不同时间段收集的上清样本于无菌EP管中,再加入20 μL 5×蛋白上样缓冲液,100 °C煮沸10 min,冷却至室温后上样进行SDS-PAGE分析蛋白表达情况。

取表达产物1 mL加入到2 mL蛋白浓缩管中,4 °C下,10 000 × g离心10 min浓缩蛋白,并取适量制备SDS-PAGE电泳样品。SDS-PAGE电泳分离蛋白后,取出凝胶,通过半干法将凝胶中蛋白条带转印于PVDF膜上进行Western Blot分析,以2% BSA作为封闭剂,于4 °C封闭过夜;IHNV多抗作为一抗,1:2000倍稀释与转印膜孵育;以HRP标记的兔抗山羊酶标抗体作为二抗,1:1000倍稀释与转印膜孵育;最后加入DAB暗室

显色15~30 min,并判定结果。

按照常规间接ELISA方法,用包被液稀释表达蛋白到不同的浓度,分别为1:1000,1:2000,1:4000,1:8000,1:16 000,1:32 000包被酶标板;将IHNV多抗稀释40、60以及80倍作为一抗,同时以山羊血清作为阴性对照;以HRP标记的兔抗山羊酶标抗体作为二抗,TMB为显色底物,37 °C显色15 min后中止反应测定OD₄₅₀值,并计算P/N,以确定抗原蛋白的反应原性及最佳稀释度。

重组蛋白与IHNV全病毒的反应原性比较分析 通过紫外分光光度计测定浓缩蛋白浓度,TCID₅₀法测定IHNV的滴度,然后按照常规间接ELISA方法,蛋白浓缩样作16 000倍稀释,IHNV的细胞培养液作32 000倍稀释,同时包被酶标板,以IHNV多抗为一抗,稀释40倍使用,HRP标记的兔抗山羊酶标抗体为二抗,同时进行ELISA检测,测得OD₄₅₀值后计算出测定数据的P/N值,然后利用Excel 2007对抗原蛋白和病毒组测定值的P/N结果进行样本均值T检验统计分析,若T < 自由度df=n-1及给定显著水平为0.05的临界值,则表明样品内和样品间无显著性差异^[14],即抗原蛋白和病毒可以在一定程度上相互替代。

重组蛋白的稳定性检测 取表达蛋白浓缩物冻存于-20 °C冰箱2个月,并在冻存前后按照常规方法进行间接ELISA分析,通过OD₄₅₀测定值及P/N值对比分析其稳定性。蛋白浓缩物作16 000倍稀释包被酶标板,同时将IHNV多抗稀释40倍作为一抗,HRP标记的兔抗山羊酶标抗体为二抗,测得OD₄₅₀值后计算出测定数据的P/N值,然后利用Excel 2007对样本内和样本间的P/N结果进行样本均值T检验统计分析,若T < 自由度df=n-1及给定显著水平为0.05的临界值,则表明样品内和样品间无显著性差异^[14],抗原蛋白在-20 °C冰箱可稳定存在2个月。

2. 结果

2.1 IHNV-G 基因真核表达重组质粒的构建

以IHNV-uk株核酸为模版,加入特异性引物G1和G2进行的RT-PCR扩增产物大小约1500 bp,无非特异性扩增(图1)。通过Zeocin™(25 μg/mL)抗性筛选获得的单克隆菌落,从中挑取6个单菌落进行特异性PCR鉴定,产物长度与理论值一致

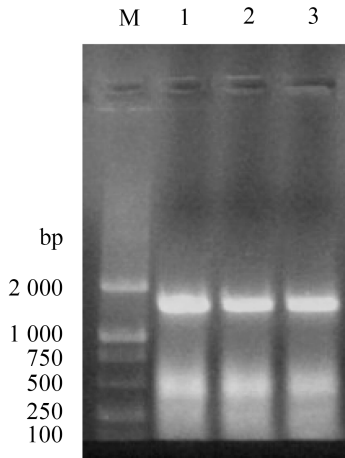


图 1 RT-PCR扩增结果

M. DI2000 DNA分子标准; 1~3. RT-PCR扩增产物

Fig. 1 The products amplified by RT-PCR

M. DI2000 DNA Marker; 1-3. the product by RT-PCR

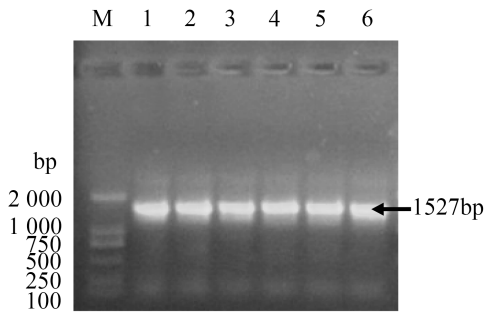


图 2 重组质粒PCR鉴定结果

M. DI2000 DNA分子标准; 1~6. 重组质粒

Fig. 2 The result of recombinant plasmids PCR

M. DI2000 DNA Marker; 1-6. the recombinant plasmids

(图2), 初步确定为阳性重组质粒, 继续进行双酶切鉴定, 结果也与理论相符(图3)。测序结果

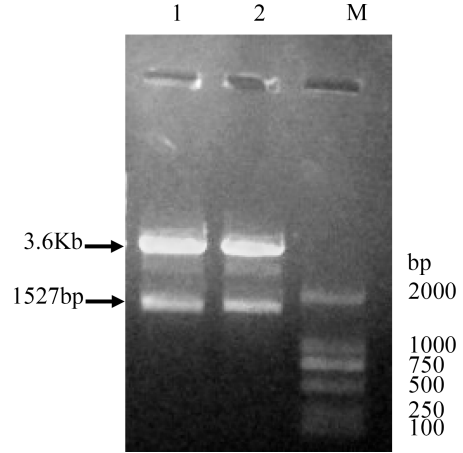


图 3 重组质粒双酶切鉴定

M. DI2000 DNA 分子标准; 1~2. 重组质粒

Fig. 3 Recombinant plasmids digested by two enzymes

M. DI2000 DNA marker; 1-2. the recombinant plasmids

经分析比对, 克隆片段长度为1527 bp, 与IHNV-G序列(No:L40883.1)相似率达99%。

2.2 IHNV-G与酵母基因阳性融合质粒的筛选

从YPDS+ZeocinTM(100μg/mL)抗性平板挑选10个单菌落, 分别用酵母菌通用引物和IHNV-G特异性引物通过PCR进行鉴定, 结果显示其中9个单克隆菌落为阳性融合菌(图4)。

2.3 阳性融合质粒的诱导表达及分析鉴定

SDS-PAGE电泳分离表达样本, 位于80ku附近显示有可溶性蛋白产物(图5)。浓缩蛋白SDS-PAGE分离后转膜进行Western Blot分析, 结果显示该蛋白可以被IHNV多抗特异性识别(图6)。浓缩蛋白梯度稀释后与不同浓度山羊阴性和

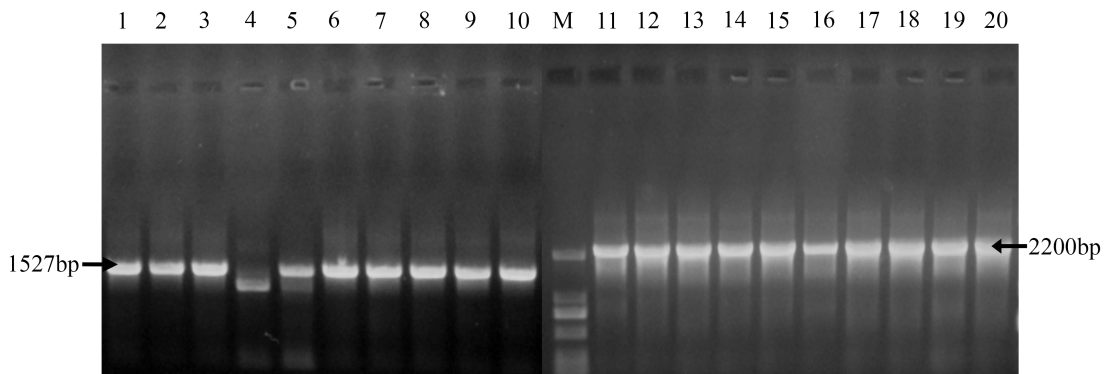


图 4 融合酵母PCR鉴定结果

M. DL 2000 DNA分子标准; 1~10. 特异性引物PCR产物; 11~20. 通用引物PCR产物

Fig. 4 The result of recombinant yeast colony PCR

M. DL 2000 DNA marker; 1-10. the products of specific PCR; 11-20. the products of universal PCR

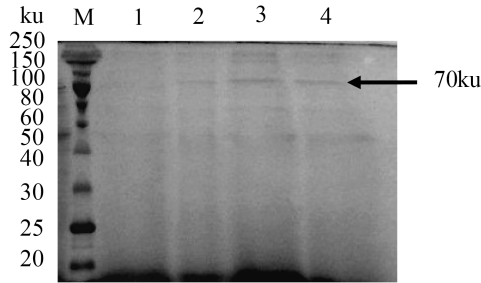


图5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

M. 蛋白质分子量标准; 1-4. 依次为诱导0, 24, 72, 120 h样本

Fig. 5 SDS-PAGE analysis

M. protein ladder; 1-4. the induced samples in 0, 24, 72, 120 h

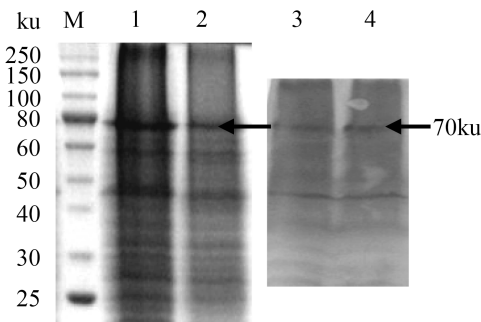


图6 Western Blot分析

M. 蛋白质分子量标准; 1~2. 浓缩蛋白SDS-PAGE分离; 3~4. 浓缩蛋白Western Blot印迹

Fig. 6 Western Blot analysis

M. protein ladder; 1-2. SDS-PAGE results of concentrate protein; 3-4. Western Blot results of concentrate protein

IHNV阳性血清进行间接ELISA反应, 结果显示稀释16000倍的抗原蛋白和稀释40倍的IHNV多抗血清反应原性最好。

2.4 重组蛋白和病毒的反应原性对比分析

重组蛋白和病毒间接ELISA对比分析显示, 2个组OD₄₅₀测定结果的P/N均大于2.1(表2), 利用

Excel对2个组P/N值进行数据统计分析, 得知 $|t|=0.487 < t_{0.05}(6)=2.447$ (表3), 表明2个组分析值组间组内无显著性差别, 即1.531 μ g的表达蛋白和0.3125 TCID₅₀个IHNV反应原性相当。

2.5 重组蛋白的稳定性分析

重组蛋白在-20 °C存放2个月前后的间接ELISA数据显示, 包被的所有蛋白OD₄₅₀测定结果P/N均大于2.1(表4), 用Excel对2个组P/N值进行数据统计分析得知 $|t|=0.411 < t_{0.05}(6)=2.447$, 表明2个组分析值组间组内无显著性差异(表5), 即重组蛋白在-20 °C存放2个月前后反应原性差异不显著, 该重组蛋白可以在-20 °C存放2个月不影响反应效果。

3. 讨论

参考物质在保证体外诊断实验结果准确性以及诊断试剂质量上具有重要意义。参考物质是国家法定用于实验室认证, 保证产品质量, 数据权威性的特殊产品, 也是生产商保证其产品溯源性的重要依据^[15]。

本研究选用毕赤酵母真核表达系统, 结合分泌型表达载体pPICZaA实现了IHNV糖蛋白的分泌表达, SDS-PAGE分析显示分子量大小接近80 ku, 比理论值70 ku大; 且在Western Blot分析中显示有2条特异性识别条带, 可能是由于蛋白表达后的糖基化修饰所致。杨婕^[16]指出毕赤酵母对分泌蛋白糖基化修饰的生物学过程复杂, 有的以O-糖基化修饰, 有的以N-糖基化修饰, 也有蛋白在天然宿主中发生糖基化修饰, 而在毕赤酵母中不发生糖基化修饰。李方等^[17]在研究白斑综合症病毒囊膜蛋白VP28基因在毕赤酵母中的表达时也发现有2个特异性表达蛋白, 其中一个

表2 表达蛋白和IHNV全病毒的反应原性测定

Tab. 2 Reactinogenicity determination of expressed protein and IHNV

包被抗原 coating antigen	项目 items	项目450 nm光密度值 OD ₄₅₀ value							
		表达蛋白 the expressed protein	阴性 Neg	0.224	0.215	0.232	0.242	0.247	0.249
	阳性 Pos	2.434	2.315	2.480	2.558	2.590	2.594	2.487	2.630
	P/N	10.866	10.767	10.690	10.570	10.486	10.418	10.720	10.273
病毒 IHNV	阴性 Neg	0.229	0.226	0.237	0.247	0.243	0.253	0.236	0.251
	阳性 Pos	2.447	2.435	2.485	2.591	2.583	2.669	2.489	2.699
	P/N	10.686	10.774	10.485	10.490	10.630	10.549	10.547	10.753

表 3 T检验成对双样本均值分析结果

Tab. 3 T-test double sample mean analysis in pairs

项目 items	表达蛋白组 the expressed protein group	病毒组 ihnv group
平均 mean	10.56057143	10.604
方差 variance	0.032242619	0.014201333
观测值 observed value	7	7
泊松相关系数 Poisson's coefficient	-0.213544783	
假设平均差 hypothesis mean deviation	0	
自由度df	6	
t 值 t start	-0.48736435	
P(T < =t)单尾 single tail	0.321646957	
t 单尾临界 single tail threshold	1.943180281	
P(T < =t)双尾 double tail	0.643293913	
t 双尾临界 double tail threshold	2.446911851	

表 4 表达蛋白稳定性对比

Tab. 4 Comparison for the stability of expressed protein

测定时间 test time	项目 items	450 nm光密度值 OD ₄₅₀ value							
两月前 two months ago	阴性 Neg	0.224	0.215	0.232	0.242	0.247	0.249	0.232	0.256
	阳性 Pos	2.434	2.315	2.480	2.558	2.590	2.594	2.487	2.630
	P/N	10.866	10.767	10.690	10.570	10.486	10.418	10.720	10.273
两月后 two months later	阴性 Neg	0.102	0.085	0.082	0.071	0.072	0.071	0.070	0.067
	阳性 Pos	1.087	0.903	0.862	0.747	0.754	0.727	0.719	0.715
	P/N	10.657	10.941	10.512	10.521	10.472	10.239	10.271	10.672

表 5 检验成对双样本均值分析结果

Tab. 5 T-test double sample mean analysis in pairs

项目 items	存放前组 before place group	存放后组 after Place group
平均 mean	10.56057143	10.51828571
方差 variance	0.032242619	0.057275905
观测值 observed value	7	7
泊松相关系数 Poisson's coefficient	0.178845931	
假设平均差 hypothesis mean deviation	0	
自由度 df	6	
t 值 t start	0.410861268	
P(T < =t)单尾 single tail	0.347722371	
t 单尾临界 Single tail threshold	1.943180281	
P(T < =t)双尾 double tail	0.695444741	
t 双尾临界 double tail threshold	2.446911851	

分子量大小符合理论值, 另一个比理论值大, 后通过实验证实是由于表达蛋白超糖基化修饰和信号肽未被切除所致。为了确定该表达蛋白

可以替代病毒, 本研究通过间接ELISA对比分析了表达蛋白和病毒的反应原性, 并对反应结果进行数据统计分析, 结果显示1.531 μ g的重组蛋

白和0.3125TCID₅₀ IHNV反应原性无显著性差异。作为参考物质必须能够在一定温度条件下一定时间内稳定存在, 本研究中将该表达产物在-20 °C存放2个月, 存放前后对比其反应原性, 然后对测定结果进行数据统计分析, 结论是存放前后的蛋白反应原性并无明显差异, 也即该表达蛋白在-20 °C可以稳定存在2个月。总之, 该表达蛋白具有可替代IHNV的反应原性当量, 也符合一定的稳定性条件, 因此可以说它在一定程度上可以替代IHNV作为免疫学检测参考物质, 这为病毒检测ELISA试剂盒的开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 徐黎明, 刘淼, 曾令兵, 等. 一株传染性造血器官坏死病病毒的致病性研究[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1584-1591.
Xu L M, Liu M, Zeng L B, *et al.* Pathogenicity analysis of infectious haematopoietic necrosis virus isolate [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1584-1591 (in Chinese).
- [2] Winton J R. Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1991, 1: 83-93.
- [3] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 传染性造血器官坏死[J]. 中国水产, 2011, (2): 56-57.
Chen A P, Jiang Y L, Qian D, *et al.* Infectious haematopoietic necrosis [J]. China Fisheries, 2011, (2): 56-57(in Chinese).
- [4] Kurath G, Leong J C. Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein [J]. Journal of Virology, 1985, 53(2): 462-468.
- [5] Morzunov S P, Winton J R, Nichol S T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Virus Research, 1995, 38(2-3): 175-192.
- [6] 徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒-Sn1203株的基因型及糖蛋白的生物信息学分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 180-188.
Xu L M, Liu H B, Yin J S, *et al.* The genotype of infectious haematopoietic necrosis virus isolate IHNV-Sn1203 and the bioinformatics analysis of its glycoprotein [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 180-188 (in Chinese).
- [7] LaPatra S E, Evilia C, Winston V. Positively selected sites on the surface glycoprotein(G) of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Journal of General Virology, 2008, 89(3): 703-708.
- [8] Verjan N, Ooi E L, Nochi T, *et al.* A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1-2): 170-180.
- [9] 朱旭, 兰文生, 刘荭, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白抗血清的制备及应用[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(6): 112-117.
Zhu X, Lan W S, Liu H, *et al.* Antiserum preparation for infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) glycoprotein and its application in IHNV detection [J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(6): 112-117 (in Chinese).
- [10] 郑怀东, 刘学光, 杜杨, 等. 传染性造血器官坏死病毒G蛋白的原核表达及纯化[J]. 水产科学, 2013, 32(4): 232-235.
Zheng H D, Liu X G, Du Y, *et al.* Prokaryotic expression and purification of G protein in infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Fisheries Science, 2013, 32(4): 232-235 (in Chinese).
- [11] 杨梅, 温真, 林丽玉, 等. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(4): 46-51.
Yang M, Wen Z, Lin LY, *et al.* Advances of expression system of *Pichia pastoris* protein [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, (4): 46-51(in Chinese).
- [12] 姜焱. 毕赤酵母表达动物传染病病原基因的研究进展[J]. 生物信息学, 2006, 4(2): 81-84.
Jiang Y. Advance of pichia yeast expression system applied in animal infectious disease agent gene [J]. China Journal of Bioinformatics, 2006, 4(2): 81-84 (in Chinese).
- [13] 卢颖, 佟伟, 单颖, 等. 人轮状病毒外衣壳糖蛋白VP7基因毕赤酵母重组表达系统的构建[J]. 现代预防医学, 2010, 37(18): 3523-3524.
Lu Y, Tong W, Shan Y, *et al.* Construction of VP7 gene of human rotavirus in *Pichia pastoris* expression system [J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(18): 3523-3524 (in Chinese).
- [14] 欧阳叙向. 生物统计附试验设计[M]. 重庆: 重庆大学

- 出版社, 2007.
- Ouyang S X. Biometry and experimental design [M]. Chongqing: Chongqing University Press, 2007(in Chinese)
- [15] 王菲菲, 郑秋丽, 张春涛. 国内外参考物质管理浅析[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(3): 80–83.
- Wang F F, Zheng Q L, Zhang C T. Analysis of the reference materials management in both domestic and foreign countries [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2013, 41(3): 80–83(in Chinese).
- [16] 杨婕. 毕赤酵母表达外源蛋白糖基化研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2014, 36(2): 20–22.
- Yang J. Glycosylation of heterologous proteins in *Pichia pastoris* [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 36(2): 20–22 (in Chinese).
- [17] 李方, 叶巧真, 何建国, 等. 白斑综合征病毒囊膜蛋白 vp28基因在毕赤酵母中的表达[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 491–494.
- Li F, Ye Q Z, He J G, *et al*. Expression of the envelope protein gene vp28 of the white spot syndrome virus in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(5): 491–494 (in Chinese).

Preparation of reference protein for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)

WANG Shuyun¹, GAO Zhiqiang¹, ZHANG Min², GU Qiang¹, REN Tong¹, LIU Yanhua¹,
JIANG Yulin², ZHANG Lifeng¹

(1. Inspection and Quarantine Technical Center of Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China.)

Abstract: To avoid the biosecurity risk of live virus used as a reference material, the glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) was expressed in *Pichia* expression system to prepare reference protein, then it can be used as reference material in immunological assay. The IHNV-uk glycoprotein gene (IHNV-G) was amplified by RT-PCR with the specific primers designed according to the GenBank IHNV gene sequence, then the IHNV-G was cloned to pPICZαA and transformed into GS115 to make gene fusion system of the target gene and yeast. The fusion gene was induced by 1% methanol to get soluble glycoprotein, the molecular weight of protein is than 70ku in SDS-PAGE analysis. and reactinogenicity of expressed protein was determined with goat polyclonal antibodies against IHNV by Western Blot analysis. The reactinogenicity of 0.1531 mg expressed protein was comparable to 0.3125TCID₅₀ IHNV in ELISA analysis, and the expressed protein can exist stably for two months at -20 °C. So it was proved that the expressed protein can replace IHNV as reference material. The study provides a foundation for the development of virus ELISA test kit.

Key words: infectious hematopoietic necrosis virus; reference protein; *Pichia pastoris*

Corresponding author: ZHANG Lifeng. E-mail: zlf1973@163.com

Funding projects: National Quality Inspection System Public Welfare Industry Special Scientific Research Projects(201310221)