

哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 真核表达载体构建及在毕赤酵母中的表达

何超军¹ 邱杨玉¹ 毛芝娟² 陈吉刚² 吴志新¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100

摘要 采用已构建的原核重组质粒 pET30a-OmpK 为模板, 通过 PCR 扩增 OmpK 成熟肽基因片段, 引入酶切位点后克隆至分泌表达载体 pPIC9K, 经 Sal I 线性化后, 氯化锂法转化至毕赤酵母 GS115 中, 并经 G418 遗传霉素筛选高拷贝酵母转化子, 最后进行甲醇诱导表达, 表达上清经 SDS-PAGE 电泳检测及 Western-blot 鉴定, 表明重组蛋白已经表达。

关键词 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*); 外膜蛋白 OmpK; 表达载体; 毕赤酵母; 表达

中图分类号 Q 782 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0646-06

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是一种革兰氏阴性、发光的海洋细菌^[1], 为水产养殖鱼虾类的重要致病菌^[2-5], 传统防治该弧菌病的方法是采用抗生素, 但抗生素使用过程中引起的病原菌耐药性及药物残留不容忽视, 采用免疫预防的方法控制该细菌病受到人们的广泛关注。

外膜蛋白(outer membrane proteins, Omps)是革兰氏阴性菌细胞壁特有的成分, 其在菌体自身结构稳定及物质转运方面发挥着重要的作用。对宿主而言, 病原菌 Omps 是一种重要的保护性抗原, 能有效激发机体的体液免疫和细胞免疫^[6-8]。并且, 某些 Omps 还在多种病原菌间高度保守, 可对不同种或同种不同血清型菌株的感染产生交叉保护, 从而成为亚单位疫苗最具潜力的候选成分之一^[9-12]。弧菌外膜蛋白 OmpK 是一种宽宿主的噬菌体受体^[13], 具有良好的免疫原性^[14-15], 并在多种弧菌间高度保守^[16], 针对 OmpK 亚单位疫苗的研制已经部分开展, 并取得了一定的效果^[14-17], 但这些亚单位疫苗大多是采用大肠杆菌表达, 表达的抗原蛋白很难重现其天然构象, 并易形成包涵体。本试验构建了毕赤酵母工程菌 GS115/pPIC9K-OmpK, 在甲醇的诱导作用下分泌表达外膜蛋白 OmpK, 表达的外源蛋白不仅具有生物活性而且易于纯化, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 为浙江万里学院生物与环境重点实验室保存, 真核表达质粒 pPIC9K 为 Invitrogen 公司产品, 包含哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 成熟肽基因的原核表达质粒 pET30a-OmpK 为笔者所在实验室人员前期构建。

1.2 分子生物学试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 和 *Sal* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA marker、蛋白质低分子量标准均为 TaKaRa 公司产品; 溶细胞酶 Lyticase 为 Sigma 公司产品; 鲑鱼精 DNA 为上海索莱宝有限公司产品; 兔抗 OmpK 包涵体血清由南京金斯瑞公司制备; 羊抗兔免疫球蛋白抗体、W-TMB 显色试剂盒、YNB、生物素、葡萄糖、蛋白胨、酵母提取物、遗传霉素 G418、氯化锂、PEG3350 均为上海生工生物工程有限公司产品。

1.3 培养基

本研究主要用到 YPD、MD、MM、RDB、BM-GY、BMMY 培养基, 配方参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册(说明书)。

1.4 PCR 引物

本研究所用 2 对引物, 均由上海生工生物工程

收稿日期: 2010-12-23

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y308408)、宁波市科技局择优委托项目(2007C10037)

何超军, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类病害与免疫。E-mail: 418080860@qq.com

通讯作者: 毛芝娟, 副教授, 研究方向: 水产动物疾病与免疫。E-mail: zhijuanmao@tom.com

有限公司合成。引物 P1、P2 为 *OmpK* 基因克隆用, P1: 5'-GGAATTCGCTGACTACTCAGACGGCG-3' (下划线为 *EcoRI* 酶切位点), P2: 5'-ATAAGAA TGCGGCCGC TTAGAACTTGTAAGTTACTGC -3' (下划线为 *NotI* 酶切位点); 引物 P3、P4 为酵母醇氧化酶 AOX1 基因鉴定引物, P3: 5'-GACTGGTTC-CAATTGACAAGC-3', P4: 5'-GCAAATGGCAT TCTGACATCC-3'。

1.5 pPIC9K-OmpK 载体的构建

以表达质粒 pET30a-*OmpK* 为模板, 上下游引物 P1、P2 扩增 *OmpK* 成熟肽基因, 在此成熟肽序列的两端分别引入了 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点, 扩增条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后, 用 *EcoRI*、*NotI* 双酶切, 与经相同酶双酶切的 pPIC9K 质粒建立连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 然后涂布于含卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上, 抗性克隆经菌液 PCR 和质粒双酶切鉴定, 并送交上海 Invitrogen 公司测序。

1.6 重组质粒的单酶切线性化

SDS-碱裂解法提取重组质粒 pPIC9K-*OmpK* 和原始质粒 pPIC9K, 经 *SalI* 单酶切 3 h, 用酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇回收, 收集沉淀, 干燥, 以灭菌 ddH₂O 溶解得到线性化的质粒 DNA。

1.7 重组质粒的氯化锂法转化及 G418 筛选

1) 感受态毕赤酵母的制备。参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册 (说明书) 进行。

2) 重组质粒的转化。煮沸 1 mL 2 mg/mL 的鲑鱼精 DNA 7~10 min, 迅速冰浴以制备单链单体 DNA, 取 60 μL 感受态酵母菌离心, 去除残余的 LiCl 溶液。按顺序加入下列成份: 50% PEG3350 240 μL , 1 mol/L LiCl 溶液 36 μL , 2 mg/mL 单链鲑鱼精 DNA 25 μL , 5~10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 质粒 DNA 50 μL 。剧烈旋涡 90 s 直至菌体分布均匀, 30 °C 水浴孵育 30 min, 42 °C 热激 25 min, 8 000 r/min 室温离心 6 min 收集酵母菌体并以 1 mL YPD 液体培养基悬浮, 250 r/min, 30 °C 摇菌 2~3 h 后离心去除部分上清, 吹打菌体混匀, 以 100~200 μL 涂于 MD 或 RDB 平板上, 30 °C 培养 2~4 d 后即可见转化子。

3) G418 遗传霉素筛选。以 1~2 mL 的无菌水冲洗 MD 或 RDB 平板上的所有转化子, 稀释至约 5×10^5 cells/mL, 各取 200 μL 分别涂布于含 0.25、

0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 3~5 d 观察结果。

1.8 高拷贝转化子的甲醇利用表型鉴定和 PCR 鉴定

点种高浓度 G418 平板上的酵母单菌落于 MM、MD 平板上进行甲醇表型利用鉴定, 确保先点 MM 平板, 且在 MM 平板里每隔 24 h 添加 100 μL 的甲醇, 2~3 d 后记录结果。选取 Mut⁺ 表型的转化子分别以目的片段的特异性引物 P1、P2 和酵母 AOX1 基因通用引物 P3、P4 进行菌落 PCR。进行菌落 PCR 前模板 DNA 的获取采用如下步骤: 挑取酵母单菌落重悬于 10 μL 无菌 ddH₂O 中, 加入 5 μL (5 U/ μL) 的溶细胞酶 Lyticase, 30 °C 孵育 20 min, 期间用枪头吹打菌悬液 1~2 次, 孵育后将样品煮沸 5 min, 冰浴 5 min, 重复此煮冻操作 1 次, 然后短暂离心数秒, 吸取上清进行 PCR。引物 P1、P2 的扩增条件如本文“1.5”。酵母 AOX1 基因通用引物的扩增条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 52.7 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.9 阳性转化子的诱导表达与鉴定

挑取酵母阳性单克隆, 接种至 12.5 mL BMGY 培养基中, 30 °C, 250 r/min 摇菌至 $D_{600} = 2.0 \sim 6.0$, 离心收集菌体, 用 BMMY 培养基重悬细胞至 $D_{600} = 1.0$, 30 °C, 225 r/min 诱导表达, 每隔 24 h 添加甲醇至终体积分数为 1%, 分别在诱导后 24、48、72、96 h 取样, 取上清与 2 \times 上样缓冲液混合后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.10 免疫印迹

表达上清经 12% SDS-PAGE 电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。加入一抗 (兔抗原核表达的 *OmpK* 血清, 1:1 000 稀释, *OmpK* 的原核表达和纯化数据未在此文显示), TBST (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.05% (V/V) Tween-20) 清洗后加入二抗 (辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG, 1:1 000 稀释), TBST 清洗, 最后用 W-TMB 显色试剂盒进行显色, 待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

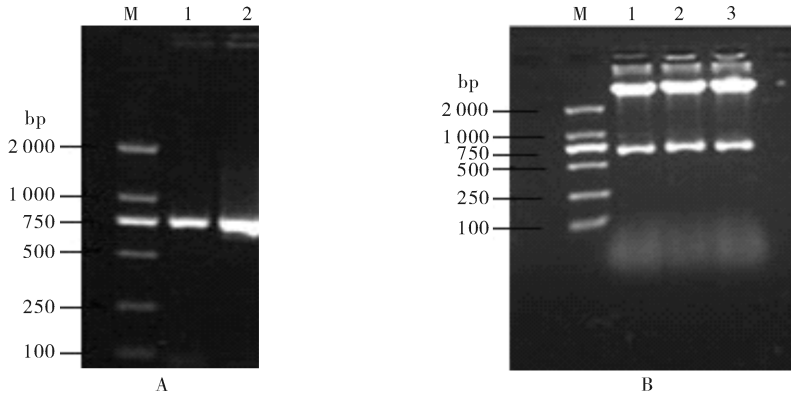
2 结果与分析

2.1 pPIC9K-OmpK 真核表达载体的构建与鉴定

pPIC9K-*OmpK* 真核表达载体的构建与鉴定结

果见图1。已知 *OmpK* 成熟肽基因序列长为 741 bp(GenBank 序列号:AY332563),引物 P1、P2 扩增出的目的片段符合预期结果(图 1-A);重组质粒 pPIC9K-*OmpK* 经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后出现 2

条片段(图 1-B),1 条片段大小约为 750 bp,为目的片段,另 1 条片段大小约为 9 300 bp,为 pPIC9K 质粒,表明重组载体构建成功。测序结果也表明,插入的序列与原 *OmpK* 基因序列完全相同。



M: 核酸分子质量标准 DNA marker DL 2 000;

A:1,2. *OmpK* 基因 *OmpK* gene; B:1,2,3. 重组质粒 pPIC9K-*OmpK* Recombinant plasmid pPIC9K-*OmpK*

图1 *OmpK* 成熟肽基因的 PCR(A)和表达载体 pPIC9K-*OmpK* 的双酶切鉴定(B)

Fig.1 PCR amplifying of mature peptide coding sequence of *OmpK* (A) and restriction enzyme digestion of expression vector pPIC9K-*OmpK* (B)

2.2 重组质粒的转化及遗传霉素 G418 筛选

本试验采用氯化锂法制备酵母感受态细胞进行转化,获得了理想的效果。野生型 GS115 在组氨酸脱氢酶位点(*His4*)有突变,不能合成组氨酸,具有组氨酸营养缺陷标记,因此只有转化了重组质粒的酵母才能在缺乏组氨酸的 MD 平板上生长。转化的酵母细胞涂布于 MD 平板,经 2~3 d 后发现每板上均长出约 80~100 个单菌落。外源基因常以单拷贝或多拷贝的形式整合入酵母基因组,通过 G418 遗传霉素可筛选多拷贝子,重组质粒和原始质粒转化后的酵母转化子涂布于含 4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板,经过 3~5 d 后分别长出了 100~200 个转化子。

2.3 高拷贝转化子的甲醇利用表型鉴定及 PCR 鉴定

重组质粒 pPIC9K-*OmpK* 和原始质粒 pPIC9K 经 *Sal* I 单酶切线性化后,转化 GS115 时,大多在宿主基因组的 *His4* 位点上发生同源重组,所以大多数转化子是 *Mut*⁺ 表型。然而由于质粒本身也含有 *AOX1* 基因序列,有可能在宿主基因组的 *AOX1* 位点发生重组,从而破坏掉野生型 *AOX1* 基因,产生 *His*⁺ *Mut*⁺ 型转化子,在 MM 和 MD 平板生长比较试验中,培养 3 d 后,大多数转化子在 MM 和 MD

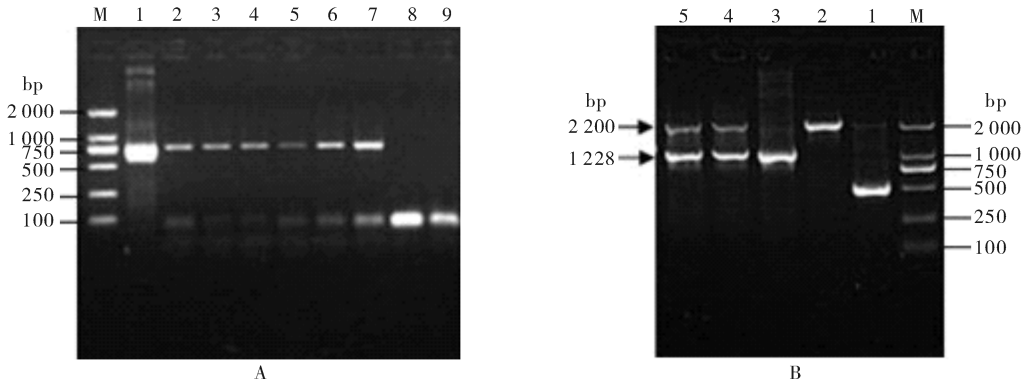
平板上的菌落大小相近,平均直径约 5 mm,这说明转化子大多都是 *Mut*⁺ 型。在菌落 PCR 实验中,用 *OmpK* 基因特异性引物 P1、P2 扩增出 1 条大小约为 750 bp 的片段(图 2-A),用酵母 *AOX1* 基因通用引物扩增时,由于大多数转化子是 *Mut*⁺ 型,没有替换掉野生型 GS115 的 *AOX1* 基因,因此会扩增出 2 条带,1 条带为野生型 GS115 的 *AOX1* 基因,大小约为 2 200 bp;1 条为整合的目的基因,加上载体上的部分序列后大小为 1 228 bp;转化了原始质粒 pPIC9K 的酵母转化子也扩增出 2 条带,1 条带大小约为 2 200 bp,另 1 条带大小为 493 bp(图 2-B)。PCR 的结果进一步验证了所得转化子为利用甲醇生长的野生型 *Mut*⁺。

2.4 阳性转化子的诱导表达与 Western-blot 鉴定

整合了重组质粒 pPIC9K-*OmpK* 的酵母转化子在甲醇的诱导下,第 2 天开始在上清中出现分泌蛋白,分子质量约为 36 ku(图 3-A)。本研究中转转化子 GS115/pPIC9K-*OmpK* 表达的重组蛋白预期在信号肽连接处断开,*OmpK* 成熟肽基因片段自身大小为 741 bp(其自身带有终止序列),加上载体上的部分序列后长 765 bp,编码 254 个氨基酸残基的多肽,重组蛋白预期分子质量为 28.8 ku。毕赤酵母在分泌表达外源蛋白时可对其进行糖基化等修饰,

其潜在的可识别的糖基化位点通常为 Asn-X-Ser/Thr, 在线糖基化位点预测软件 NetNGlyc 预测 OmpK 重组蛋白中含有一个潜在的糖基化位点, 预期酵母表达的重组 OmpK 分子质量会大于 29 ku。本研究中重组蛋白分子质量约为 36 ku, 可能是过度糖基化的缘故, 这在酵母表达中是经常出现的现象^[18-20]。

E. coli BL21(DE3)表达的 OmpK 包涵体蛋白, 经纯化复性后作为抗原免疫新西兰兔, 制备了多抗血清。免疫印迹结果表明, 酵母表达的重组蛋白可与兔抗 OmpK 的多抗血清发生印迹反应(图 3-B), 表明重组蛋白的抗原性未受明显影响。



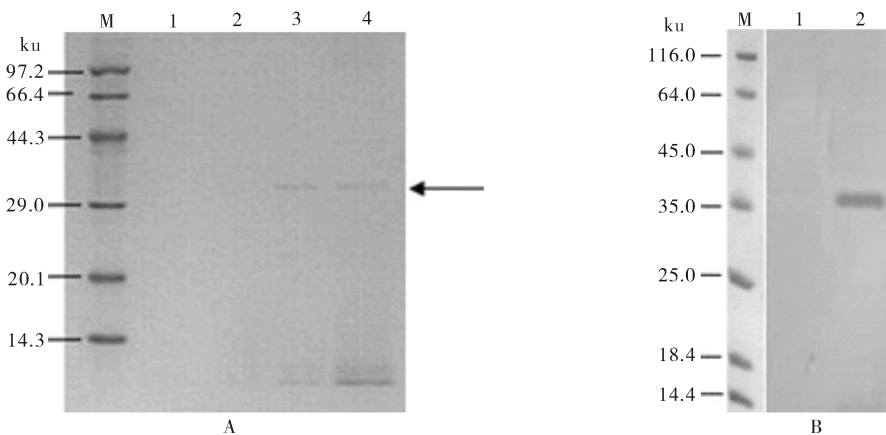
M: 核酸分子质量标准 DNA marker DL 2 000;

A: 1. 重组质粒 pPIC9K-OmpK 阳性对照 Positive control of recombinant plasmid pPIC9K-OmpK; 2~7. 转化子 GS115/pPIC9K-OmpK Transformants GS115/pPIC9K-OmpK; 8. 野生型 GS115 阴性对照 Negative control of GS115; 9. ddH₂O 为模板阴性对照 Negative control of ddH₂O;

B: 1. 转化子 GS115/pPIC9K Transformant GS115/pPIC9K; 2. 野生型 GS115 阴性对照 Negative control of GS115; 3. 重组质粒 pPIC9K-OmpK 阳性对照 Positive control of recombinant plasmid pPIC9K-OmpK; 4, 5. 转化子 GS115/pPIC9K-OmpK Transformants GS115/pPIC9K-OmpK.

图 2 特异性引物 P1、P2 PCR(A) 和 AOX1 通用引物 PCR 鉴定转化子(B)

Fig. 2 Identification of positive transformants by PCR with specific primers P1, P2(A) and *Pichia pastoris* AOX1 general primers P3, P4(B)



M: 蛋白分子质量标准 Molecular weight protein marker;

A: 1. 转化子 GS115/pPIC9K 经甲醇诱导后第 3 天的培养基上清 Supernatant products of transformant GS115/pPIC9K induced by methanol after 3 d; 2, 3, 4. 转化子 GS115/pPIC9K-OmpK 经甲醇诱导后 1~3 d 的培养基上清 Supernatant products of transformant GS115/pPIC9K-OmpK induced by methanol after 1-3 d; B: 1. 转化子 GS115/pPIC9K 的发酵产物 Supernatant products of GS115/pPIC9K; 2. 转化子 GS115/pPIC9K-OmpK 的发酵产物 Supernatant products of GS115/pPIC9K-OmpK.

图 3 GS115/pPIC9K-OmpK 诱导上清液的 SDS-PAGE(A) 和 Western-blotting(B)

Fig. 3 SDS-PAGE(A) and Western-blotting(B) analysis of culture supernatant of GS115/pPIC9K-OmpK

3 讨 论

大肠杆菌表达系统和酵母表达系统是目前已建立的原核和真核表达系统的代表,前者具有遗传背景清楚、繁殖快、成本低、抗污染能力强以及适用广等优点,而后者是近年来迅速发展起来的一种具有诸多优点的表达系统,它不仅具有大肠杆菌生长繁殖迅速、营养要求简单、可工业化、大规模发酵的优点,而且具有对表达的外源蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰的能力,使得表达的蛋白更加接近于天然状态,具有良好的生物活性。大肠杆菌中表达的重组蛋白多以包涵体的形式表达,重组蛋白分离时必须先破碎细胞,方法诸如超声波裂解、弗氏压碎、反复冻融、溶菌酶处理等,操作上比较繁杂,而且在利用超声波裂解等机械方法时通常会产生大量的热,尽管可以采取一些降温手段,但对于那些对热不稳定的重组蛋白尤其是酶蛋白则是相当不利的。而毕赤酵母分泌表达的蛋白则以可溶的形式存在于培养基上清中,加之以毕赤酵母本底分泌至培养基中蛋白又很少,这对于重组蛋白的分离纯化提供了便利^[21-22],通常用硫酸铵 2~3 次分级沉淀即可获得重组蛋白,如要求较高的纯度,可进一步采用凝胶过滤层析、亲和层析等手段获得,这为亚单位疫苗的研制提供了便利。

现有的弧菌外膜蛋白 OmpK 亚单位疫苗研制中多采用大肠杆菌原核表达系统^[14-17],本文则首次利用毕赤酵母真核表达系统分泌表达出哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK,表达的蛋白保持了良好的免疫原性,说明酵母表达的该蛋白也可应用于疫苗研制,并且,由于酵母作为一种相对安全的微生物,早就作为饲料中添加的成份,以酵母系统表达的亚单位疫苗可以方便地制备口服疫苗,这可能为鱼类疫苗研制提供重要的参考方向。

参 考 文 献

[1] RAMESH A, VENUGOPALAN V K. Response of enteric luminous bacteria to environmental conditions in the gut of the fish[J]. Journal of Applied Microbiology, 1989, 66(6): 529-533.

[2] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178-181.

[3] 王保坤, 余俊红, 李筠, 等. 花鲈弧菌病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 52-55.

[4] 范文辉, 黄捷, 王秀华, 等. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴

定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 665-670.

[5] 刘问, 钱冬, 杨国梁, 等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病原研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2004, 9(4): 300-304.

[6] HECKELS J E, FLETCHER J N, VIRJI M. The potential protective effect of immunization with outer-membrane protein I from *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Journal of General Microbiology, 1989, 135: 2269-2276.

[7] LOOSMORE S M, YANG Y P, COLEMAN D C, et al. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease[J]. Infection and Immunology, 1997, 65(9): 3701-3707.

[8] MUKHOPADHAYA A, MAHALANABIS D, CHAKRABARTI M K. Role of *Shigella flexneri* 2a 34 kDa outer membrane protein in induction of protective immune response[J]. Vaccine, 2006, 24: 6028-6036.

[9] FANG H M, LING K C, GE R, et al. Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion[J]. Journal of Fish Disease, 2000, 23: 137-145.

[10] 黄辉, 毛芝娟, 陈吉刚. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 的克隆、表达与免疫原性研究[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 346-350.

[11] KAWAI K, LIU Y, OHNISHI K, et al. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate[J]. Vaccine, 2004, 22: 3411-3418.

[12] MERINO S, VILCHES S, CANALS R, et al. A Clq-binding 40 kDa porin from *Aeromonas salmonicida*: cloning, sequencing, role in serum susceptibility and fish immunoprotection[J]. Microbial Pathogenesis, 2005, 38: 227-237.

[13] INOUE T, MATSUZAKI S, TANAKA S, et al. A 26 kD outer membrane protein, OmpK, common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP-40[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 125(1): 101-105.

[14] 张崇文, 于涟, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 9-14.

[15] LI N Q, BAI J J, WU S Q, et al. An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 829-833.

[16] LI N Q, YANG Z H, BAI J J, et al. A shared antigen among *Vibrio* species: outer membrane protein-OmpK as a versatile *Vibriosis* vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(5/6): 952-956.

[17] 李研东, 李菲, 卢士英, 等. 拟态弧菌 OmpK 基因的克隆及原核表达[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(6): 52-55.

[18] 李方, 叶巧真, 何建国, 等. 白斑综合症病毒囊膜蛋白 vp28 基因在毕赤酵母中的表达[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 491-494.

[19] LIN G J, LIU T Y, TSENG Y Y, et al. Yeast-expressed classi-

- cal swine fever virus glycoprotein E2 induces a protective immune response[J]. *Vet Microbiology*, 2009, 139:369-374.
- [20] QIN Y, WEI X, LIU X, et al. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 58(1): 162-167.
- [21] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66.
- [22] AOKI H, HASAN M N, WATABE S. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp[J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 31(2): 213-221.

Construction of eukaryotic expression vector of OmpK of *Vibrio harveyi* and identification of protein expression in *Pichia pastoris*

HE Chao-jun¹ QIU Yang-yu¹ MAO Zhi-juan² CHEN Ji-gang² WU Zhi-xin¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

Abstract The existing research papers have demonstrated the strong immunogenicity of outer membrane proteins to aquacultured creatures. Using the previously constructed recombinant plasmid pET30a-*OmpK* as template, the peptide coding sequence of *OmpK* was amplified by PCR. After introducing restriction sites at both 5' ends and 3' ends of the sequence, the gene was cloned into secreted expression vector pPIC9K, and formed the recombinant vector pPIC9K-*OmpK*. The vector was linearized by *Sal* I, and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 by the method of Lithium Chloride transformation. Transformants were selected by G418 and confirmed by PCR. The recombinant protein was expressed and secreted into the supernatant after inducing by methanol. SDS-PAGE analysis indicated the recombinant protein OmpK was hyperglycosylated with a molecular weight about 37 ku, larger than the expected size 29 ku. Western-blotting results showed that the recombinant protein OmpK could react with the antiserum against OmpK expressed by *E. coli* BL21. It indicated that the protein OmpK was glycosylated but remained its antigenicity.

Key words *Vibrio harveyi*; OmpK; expression vector; *Pichia pastoris*; expression

(责任编辑:边书京)