

海洋球石藻病毒(Coccolithovirus)硫氧还蛋白(Trx)在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达及其活性分析*

蔡艺钦 张稚兰 罗邦彬 刘静雯

(集美大学生物工程学院 厦门 361021)

提要 从实验室保存的 pBS-Trx 重组质粒中克隆球石藻病毒 EhV-Trx 基因, 构建毕赤酵母重组表达载体 pPIC9K-EhV-Trx, 将重组质粒电转化毕赤酵母 GS115, 诱导分泌表达并对重组蛋白进行二硫键还原酶活性分析。结果表明, EhV-Trx 基因开放阅读框为 591bp, 编码 197 个氨基酸; 在毕赤酵母 GS115 中成功诱导表达重组 EhV-Trx, 经 SDS-PAGE 分析目的蛋白分子量约为 27.8kDa; 重组 EhV-Trx 具有二硫键还原酶的活性, 能有效打开胰岛素 A、B 两条链的二硫键, 有望开发成一种新型的硫氧还蛋白脱敏制剂应用于食品安全领域。

关键词 海洋球石藻病毒(EhV), 硫氧还蛋白, 毕赤酵母, 分泌表达, 活性分析

中图分类号 Q943

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是一种机体内巯基还原系统的重要组成成分, 含有二硫化物活性中心 Cys-Gly-Pro-Cys(CGPC)(Pigiet *et al*, 1986), 二硫化物对蛋白质结构和生物学活性至关重要(Lu *et al*, 2012)。Trx 与 NADPH 和 TrxR(硫氧还蛋白还原酶)组成氧化还原调节系统(Trx 系统), 参与生物体内多种调节功能(Masutani *et al*, 2005)。Trx 首次发现并分离自大肠杆菌, 被鉴定为大肠杆菌体内核糖核酸还原酶羟基受体的二巯基酸性小蛋白(Laurent *et al*, 1964)。Trx 可作为一类机体内抗氧化防御系统、胞内外信号通路途径、转录因子调节系统和免疫应答调节系统的关键超家族蛋白, 广泛存在于各类生物体中(Nakamura *et al*, 1997; Arnér *et al*, 2000; Pekkari *et al*, 2004)。另外, Trx 单独作为蛋白质二硫键氧化还原酶促进蛋白质的折叠, 用大肠杆菌 Trx 基因构建可溶性融合表达系统已被广泛应用(安乃莉等, 1999; LaVallie *et al*, 1993; Kurokawa *et al*, 2000)。

食品安全是当今全球关注的一个焦点问题, 由于摄入含有过敏原的食物而引起过敏反应的事件有

增无减, 食物过敏这一食源性疾病已引起广大消费者、生产者和研究者的普遍关注, 食物脱敏研究已经成为一个重要的热点领域(吕相征等, 2005; 罗曾玲等, 2006)。但针对食品过敏现象目前没有有效的治疗方法, 只是尽量避免饮食含有过敏原的食物及治疗过敏引起的不良反应(Mousallem *et al*, 2011)。公认的预防方法是消除食品中的过敏原。许多过敏原蛋白结构中都有大量的二硫键, 因此可以寻求一种安全有效的硫氧还原剂破坏蛋白质分子内部的二硫键, 达到降低食品过敏性的目的(Val *et al*, 1999)。Val 等(1999)研究证明大肠杆菌的 Trx 系统可以破坏 β -乳球蛋白和麦角醇中的二硫键, 降低牛奶和小麦的过敏性而已被得到应用。海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*)病毒(EhV)基因组中发现众多功能基因, 包含 472 个 CDSs, 其中仅 14%是已知功能蛋白基因, 大量 CDSs 在现有的数据库中无法找到同源基因(Wilson *et al*, 2005)。已知的 EhV 功能基因中, SBP 基因、Trx 基因、MCP 基因、内含肽基因等有一些相关的报道。张彦锋等(2010)首次从 EhV99B1 基因组中克隆了 Trx 基因完整

* 福建省自然科学基金项目, 2010J01261 号; 集美大学中青年创新团队专项基金资助, 2010A007 号。蔡艺钦, E-mail: caiyq520@163.com

通讯作者: 刘静雯, 博士, 教授, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2012-04-10, 收修改稿日期: 2012-06-15

的 ORF(登陆号: GU109280), 并对其进行生物信息学分析, 预测得到 EhV99B1-Trx 基因编码的为一种新型的硫氧还蛋白家族成员。由此推测 EhV-Trx 可能具有还原二硫键的能力而有望作为一种新型食品脱敏剂加以开发利用。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为表达目的蛋白的一种真核表达系统, 与大肠杆菌等原核表达系统相比, 具有完整的蛋白表达后加工和修饰功能的优点(韩雪清等, 2003); 而与杆状病毒和哺乳动物细胞相比, 它又具有易发酵、成本低、产量高等优点; 另外还可以进行分泌表达, 产物便于纯化。

本文通过构建重组毕赤酵母表达载体 pPIC9K-EhV-Trx, 将 EhV-Trx 基因用电转化法整合到毕赤酵母 GS115 的染色体上, 筛选出高拷贝的重组转化子, 构建重组酵母表达菌株。对 EhV-Trx 重组酵母表达菌株进行摇瓶培养, 鉴定其产物并对重组蛋白进行二硫键还原酶活性分析, 为进一步深入研究 EhV-Trx 对二硫键蛋白过敏原的脱敏功能及应用提供科学依据, 同时也为从海洋生物体中开发生产安全的活性物质应用于食品安全领域奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与试剂 pMD19-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶、核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 均为 TaKaRa 公司产品, DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒为 TIANGEN 公司产品, 大肠杆菌菌株 Top10、毕赤酵母 GS115、pPIC9K 载体均为本实验室保存, 琼脂糖为西班牙进口分装, 测序由广州英俊生物技术有限公司完成, 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.2 引物设计 用 Primer Premier 5.0、PrimerSelect 软件设计一对特异引物进行 PCR 扩增, 本实验采用的引物为: 上游引物 Trx-F: 5'-CGGAATT CATCTTTATAATCGCACC-3' (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物 Trx-R: 5'-CCAGCGGCCGCTTAA ATTGACTCA-3' (划线部分为 *Not* I 酶切位点); 两对 pPIC9K 通用引物分别为: 5'AOX: 5'-GACTGGTTCC AATTGACAAGC-3'和 3'AOX: 5'-GGCAAATGGCAT TCTGACAT-3'; A-FACTOR: 5'-TACTATTGCCAGCA TTGCTGC-3'和 3'-AOX: 5'-GGCAAATGGCATTCTG ACAT-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 EhV-99B1 硫氧还蛋白基因的扩增 采用 TIANGEN 公司的质粒提取试剂盒, 从本实验室已构建的 pBS-Trx 重组质粒中扩增目的基因。以该重组质粒为模板, 在 25 μ l 反应体系中(无菌 ddH₂O 5.5 μ l, *Taq* 预混液 12.5 μ l, 模板 5 μ l, 引物 F 和 R 各 1 μ l)进行 PCR, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 扩增 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶检测、采用 TIANGEN 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收。

1.2.2 重组质粒 pMD19-T-EhV99B1-Trx 的构建 DNA 连接反应: PCR 产物经纯化后与 pMD19-T 载体连接。

连接反应为 10 μ l 体系: 回收 PCR 产物 4 μ l, 载体 1 μ l, *T₄* DNA ligest solution I 5 μ l, 于 16 $^{\circ}$ C 连接 16h。

大肠杆菌的转化: 被转化的感受态细胞为 *E. coli* Top10, 感受态细胞的制备方法参照《分子克隆实验指南(第 3 版)》(Sambrook *et al.*, 2001)。将 10 μ l T 克隆连接产物加入到 200 μ l 的感受态细胞中, 置冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90s, 冰浴 2min。加入到含有 800 μ l LB 培养基(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0)的试管中混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养 1h。取未离心菌液 200 μ l 涂布含氨苄青霉素(终浓度为 0.1mg/ml)的 LB 固体平板(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0, 预先涂有 40 μ l 20mg/ml 的 X-gal 与 4 μ l 200mg/ml 的 IPTG), 同时将剩余菌液于 8000r/min 离心 1min, 分别取上清、沉淀各 200 μ l 涂布平板(同上), 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养约 12h。

1.2.3 重组质粒 pMD19-T-EhV99B1-Trx 的筛选与鉴定 用灭菌的牙签挑取白斑, 接种于含有氨苄青霉素(终浓度 0.1mg/ml)的 LB 液体培养基中(组分包括 1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0), 37 $^{\circ}$ C 摇床上震荡培养 12h。采用 TIANGEN 质粒提取试剂盒提取质粒, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定重组质粒。重组质粒经 PCR 和双酶切验证目的片段, 双酶切采用 20 μ l 体系: 10 \times H buffer 2 μ l, 0.1% BSA 2 μ l, *EcoR* I 1 μ l, *Not* I 1 μ l, 重组质粒 10 μ l, 无菌 ddH₂O 4 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 3.5h, 1%琼脂糖凝胶电泳检测; 将酶切鉴定后得到的阳性克隆送广州英俊生物技术有限公司测序。

1.2.4 重组酵母表达载体的构建、筛选及鉴定 采用 TIANGEN 公司的质粒提取试剂盒提取 pMD19-T-EhV99B1-Trx 克隆质粒和表达载体 pPIC9K, 用 *EcoR* I 及 *Not* I 分别对 pMD19-T-EhV99B1-Trx 克隆质粒和

表达载体 pPIC9K 进行双酶切, 酶切产物用 TIANGEN 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 并用 T₄ DNA ligest solution I 对回收产物进行连接(连接反应为 10 μ l 体系: 回收目的基因 4 μ l, pPIC9K 载体 1 μ l, T₄ DNA ligest solution I 5 μ l, 于 16 $^{\circ}$ C 连接 16h); 转化感受态细胞大肠杆菌 TOP10, 提取质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定; 将筛选出的阳性重组表达质粒(pPIC9K-EhV99B1-Trx)经 *Sac* I 线性化后与感受态细胞毕赤酵母 GS115 混合, 电击转化至毕赤酵母 GS115 细胞; 涂布于 MD 平板上(组分包括 13.4g/L 酵母基本氮源、0.4mg/L 生物素、20g/L 葡萄糖), 30 $^{\circ}$ C 培养箱倒置培养 2—3d, 观察转化子的生长。通过 G418 浓度梯度(0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0mg/ml)筛选高拷贝转化子, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证; 菌落 PCR 模板制备: 挑取固体平板上的单菌落, 重悬于 20 μ l 无菌水中, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min, 离心取上清; 取 10 μ l 上清作为模板, 分别用 pPIC9K 的两对通用引物(5'AOX 和 3'AOX; A-FACTOR 和 3'-AOX)进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 扩增 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。菌落 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.5 硫氧还蛋白在毕赤酵母中的分泌表达 将筛选出来的重组酵母菌株(GS115/pPIC9K-EhV99B1-Trx)及实验对照菌株(GS115/pPIC9K)分别接种于 25ml BMGY(组分包括 10g/L 酵母提取物、20g/L 蛋白胨、1mol 磷酸缓冲液、13.4g/L 酵母基本氮源、0.4mg/L 生物素、1%甘油)培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 200r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ = 2.0—6.0; 2000r/min 室温离心 5min。弃上清液, 用 20ml BMMY 培养基(组分包括 10g/L 酵母提取物、20g/L 蛋白胨、1mol 磷酸缓冲液、13.4g/L 酵母基本氮源、0.4mg/L 生物素、0.5%甲醇)重悬细胞沉淀, 30 $^{\circ}$ C, 200r/min 摇床培养诱导表达; 分别在 0h、24h、48h 和 72h 取诱导菌液 1.0ml, 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 10min, 将菌液上清保存于 -20 $^{\circ}$ C 待用; 采用 SDS-PAGE 进行验证。

1.2.6 硫氧还蛋白二硫键还原酶活性检测 二硫苏糖醇(DTT)是 Trx 的还原剂, 在 DTT 存在时 Trx 可以使胰岛素 A、B 链间的二硫键还原成游离的 A、B 两条链, 由于 B 链的溶解度差, 从而使透明的反应液变混浊, 并在 690nm 处有强烈的光吸收。在 1000 μ l 反应混合物中含有 50mmol/L Tris·HCl (pH 7.5), 1mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)和 0.17mmol/L 胰岛素, 约 2.33 μ mol 的重组蛋白。加入 DTT 至终浓度 2mmol/L

启动反应, 室温下 690nm 处每隔 1min 测定 1 次光密度(OD)值, 绘制反应曲线。

2 结果与分析

2.1 目的基因的获取及 T 克隆的构建

用 Trx-F、Trx-R 特异性引物以 pBS-Trx 重组质粒作为模板得到了大小为 591bp 的目的 DNA 片段(图 1), 此片段经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后与 pMD19-T 载体连接, 构建 T 克隆(pMD19T-EhV99B1-Trx)保存目的片段(图 2)。

2.2 重组酵母表达质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx 的构建 将构建成功的 T 克隆载体与表达载体 pPIC9K 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 回收目的基因片段, 通过 DNA 连接酶连接构建重组酵母表达质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx。将构建完的重组酵母表达质粒通过 PCR 和双酶切验证, 结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出 PCR 验证能够扩增出特异的

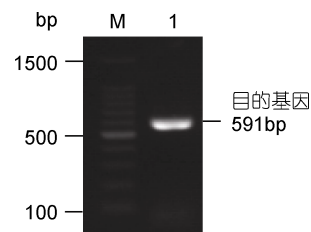


图 1 EhV-99B1-Trx 基因片段质粒 PCR 扩增产物

Fig.1 The PCR product of Trx in pBS-EhV99B1-Trx plasmid
注: M 为 100bp 的 DNA 分子量标记; 1 为 EhV99B1 的 Trx 基因片段 PCR 产物

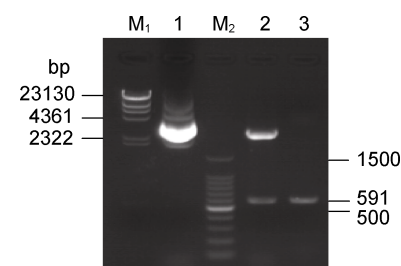


图 2 重组质粒

pMD19T-EhV99B1-Trx 的鉴定
Fig.2 The identification of recombinant plasmid pMD19T-EhV99B1-Trx in *E. coli* TOP10 positive colonies
注: M₁ 为 *-Hind* III DNA 标记, 1 为重组质粒 pMD19T-EhV99B1-Trx, M₂ 为 100bp 的 DNA 分子量标记, 2 为重组质粒 pMD19T-EhV99B1-Trx 双酶切, 3 为重组质粒 PCR 产物

目的条带, 双酶切也能切下目的条带, 而且将重组酵母表达质粒进行线性化后也能出现条带, 从而可确定重组酵母表达质粒构建成功。

2.3 G418 筛选高拷贝转化子及鉴定

用无菌水洗下 MD 平板上的菌落, 适当稀释后各取 200 μ l 涂布于 G418 终浓度分别为 0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0mg/ml 的 YPD 抗性平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3d。每个 G418 浓度平板上均长出了许多克隆。挑取 G418 浓度为 4.0 mg/ml 平板上的菌落,

划线接种到 G418 终浓度为 4.0 mg/ml 的 YPD 抗性平板上, 30 °C 培养 3d, 平板上仍长出许多单菌落。从该平板上挑取 4 个单菌落, 用两套 pPIC9K 通用引物 (5'AOX1 和 3'AOX1; α -Factor 和 3'AOX1) 分别进行菌落 PCR 验证, 结果两套引物均能扩增出条带(图略), 表明线性化的 pPIC9K-EhV99B1-Trx 成功地整合于毕赤酵母菌 GS115 染色体基因组中。

2.4 重组酵母菌株的诱导表达

将重组酵母菌株 GS115/pPIC9K-EhV99B1-Trx 单克隆以甲醇诱导表达, 分别于 0h、24h、48h 和 72h 各取样一次, 离心取上清进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 4。由于重组酵母表达菌株为 Mut⁺型, 在培养 24h 时, 就明显表达出两条靠得很近的电泳条带, 其中一条特异性蛋白分子量约为 27.8kDa, 同时伴随一条分

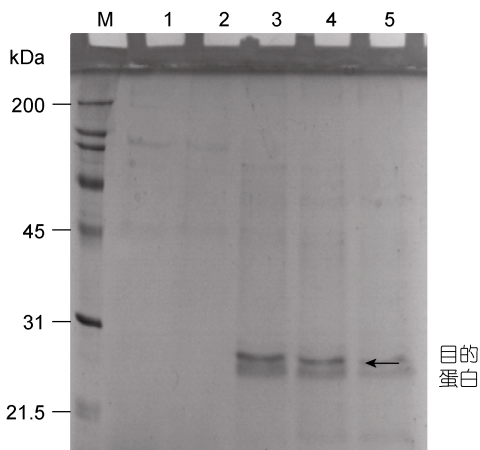


图 4 EhV99B1-Trx 重组表达产物 SDS-PAGE 电泳图
Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant EhV-99B1-Trx

注: M 为标准蛋白分子量; 1 泳道为 pPIC9K 空载未诱导的全菌总蛋白; 2—5 泳道分别为重组酵母表达质粒诱导 0h、24h、48h 和 72h 的样品全菌总蛋白

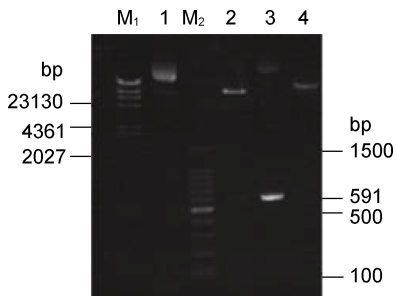


图 3 毕赤酵母重组表达载体 GS115/pPIC9K-EhV99B1-Trx 的鉴定
Fig.3 The identification of recombinant plasmid GS115/pPIC9K-EhV99B1-Trx in *P. pastoris*

注: M₁ 为 λ -Hind III DNA 标记, 1 为重组质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx, M₂ 为 100bp 的 DNA 分子量标记, 2 为重组质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx 双酶切, 3 为重组质粒 PCR 产物, 4 为 Sal I 线性化的重组质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx

子量为 25.8kDa 的微弱蛋白条带。经过多次重复实验均得出以上结果。根据生物信息学软件预测 EhV-Trx 蛋白分子量应为 22.1kDa 左右, 经过 GPS2.1 软件分析, EhV-99B1-Trx 中带有多个磷酸化位点, 因此, 推测可能是翻译后不同程度的磷酸化修饰造成两条相近的蛋白质分子条带。

2.5 重组 EhV99B1-Trx 活性检测

存在 DTT 条件下 Trx 对胰岛素 A、B 链之间的二硫键有还原作用。检测硫氧还蛋白的二硫键还原酶活性: 室温下在波长 690nm 处每隔 1min 测定 1 次反应混合液的 OD 值, 并绘制成图(图 5), 结果表明重组 EhV99B1-Trx 具有明显的二硫键还原酶活性。

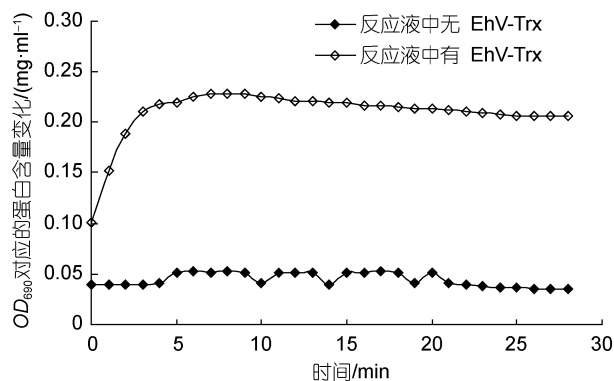


图 5 重组 EhV99B1-Trx 硫氧还蛋白酶活性测定
Fig.5 The reaction active of recombinant EhV99B1-Trx

3 讨论

本文从 pBS-Trx 重组质粒中克隆出 Trx 基因, 成功构建重组酵母表达质粒 pPIC9K-EhV99B1-Trx 并于毕赤酵母 GS115 中进行分泌表达, 经 SDS-PAGE 分析得到目的蛋白分子量约为 27.8kDa; 进一步对其活性分析, 通过重组 EhV99B1-Trx 对胰岛素分子中二硫键的还原作用进行实验, 结果表明重组 EhV99B1-Trx 具有二硫键还原酶活性。

目前多数物种的 Trx 分子量约为 12kDa, 多肽链长短在 104 个至 110 个氨基酸不等。Trx 有两种形式即 Trx1 和 Trx2, Trx1 定位于细胞核和细胞质中, 而 Trx2 只定位于线粒体中(Gelhaye *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2007)。Trx1 蛋白质分子含有 5 个 α 折叠和 4 个 α 螺旋, β 折叠被 α 螺旋紧密包围形成一个球状的结构。高度保守的催化活性中心 CGPC 就位于 β_2 折叠和 α_2 螺旋之间, 这种形式被称为 Trx 折叠。Trx 的作用机制在大肠杆菌 *E. coli* 中研究得最为详尽, 即利用活性中心的疏水侧链与底物结合后, 在复合物的疏水环

境中, Cys-32 的巯基作为亲核物质和蛋白底物结合形成共价键的二硫化物, 最后去质子的 Cys-35 作用于此二硫化物的二硫键, 释放出被还原的蛋白底物。Trx2 编码 166 个氨基酸, 大小在 18kDa 左右, 有一个保守的 Trx 催化活性位点和由 60 个氨基酸组成的 N 末端延伸, 可能是线粒体的引导序列。张彦锋等(2010)对 EhV99B1-Trx 进行生物信息学分析表明, EhV-99B1-Trx 与 Trx2 更相似, EhV99B1-Trx 与基因库中已报道的 EhV86 分离株的 Trx 基因具有高度的同源性, 但与其他原核和真核物种的 Trx 类蛋白的同源性却很低, 只有 9.8%—18.8%, 其中与原核生物的同源性相对较高些; 其 C 端氨基酸序列保守性比较差, 但 N 端氨基酸序列高度保守, 说明 N 端对维持 Trx 蛋白的结构与功能起关键作用。EhV99B1-Trx 虽然与目前所发现的 Trx 有很大的不同, 但是可以有效地打开胰岛素分子中的二硫键, 表明 EhV99B1-Trx 具有二硫键还原酶活性。因此, EhV99B1 具有成为一种安全的硫氧还原剂并应用于食品行业的潜力。

食品过敏是威胁人类健康的一个重要问题, 近年来由于食品过敏性疾病发病率迅速攀升, 人们开始重视食品过敏问题。一般食品过敏的病人在摄入过敏性食品后会在多个器官发生反应, 涉及呼吸系统、胃肠系统、中枢神经系统、皮肤等(田斌强等, 2007)。食品过敏的临床症状多样, 有时还可能产生过敏性休克, 甚至危及生命。因此, 对食品过敏的诊治和治疗是非常重要的。但针对食品过敏目前没有有效的治疗方法, 公认的预防方法是消除食品中的过敏原。目前用于消除食品过敏原的主要方法有: 物理法、酶法、生物学方法、化学法, 各种方法都存在不同程度的缺陷, 相比而言, 采用物理和化学的方法较为简便, 成本较低。许多过敏蛋白结构中都有大量的二硫键, 因此可以寻找一种安全有效的硫氧还原剂破坏蛋白质分子内部的二硫键, 达到降低食品过敏性的目的(Val *et al*, 1999)。同时, 本研究采用毕赤酵母真核表达系统, 此体系分子克隆技术简单, 具有高产、低培养成本和能生产用于治疗的功能蛋白等特点, 优于大肠杆菌表达系统最大特点是它能分泌表达含有二硫键和糖基化修饰的蛋白, 可以进行真核细胞的翻译后修饰过程, 而且可以有效地进行大规模的发酵生产(Cereghino *et al*, 2000; Demain *et al*, 2009)。据中国食品学报 2008 年科技动态报道, 日本学者已成功研制出一种 Trx 转基因抗过敏生菜并投放市场(Lim *et al*, 2011)。本实验在毕赤酵母中成功分泌表达

EhV99B1-Trx 且发现其具有二硫键还原酶活性, 为今后进一步深入研究 EhV99B1-Trx 对二硫键蛋白过敏原的脱敏功能及应用提供科学依据, 同时也为从海洋生物体中开发新型安全的 Trx 转基因脱敏食品, 改善食品过敏这一重要问题奠定了基础。

参 考 文 献

- 田斌强, 邓乾春, 谢笔钧等, 2007. 食物过敏原与过敏性消除方法. 食品科技, 32(11): 9—13
- 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光, 2005. 健康人群食物过敏状况的初步调查. 中国食品卫生杂志, 17: 19—21
- 安乃莉, 张智清, 王 嵩等, 1999. 应用硫氧还蛋白促进外源蛋白在大肠杆菌的可溶性表达. 病毒学报, 15(2): 130—135
- 张彦锋, 刘静雯, 张稚兰等, 2010. 海洋球石藻 *Emiliania huxleyi* 病毒硫氧还蛋白(TRX)基因的克隆及生物信息学分析. 海洋与湖沼, 41(2): 293—300
- 罗曾玲, 陈红兵, 2006. 乳品安全中的牛乳过敏. 食品与机械, 22(3): 147—149
- 韩雪清, 刘湘涛, 尹双辉等, 2003. 毕赤酵母表达系统. 微生物学杂志, 23(4): 35—40
- Sambrook J, Russell D W 著, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 1—96
- Arn é r E S J, Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem, 267(20): 6102—6109
- Cereghino J M, Cregg J M, 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Fems Microbiol Rev, 24(1): 45—66
- Demain A L, Vaishnav P, 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv, 27(3): 297—306
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N *et al*, 2005. The plant thioredoxin system. Cell Mol Life Sci, 62(1): 24—35
- Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T, 2000. Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple 2 disulfide 2 bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*. Appl Environ Microb, 66: 3960—3965
- Laurent T C, Moore E C, Reichard P, 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. J Biol Chem, 239: 3436—3444
- LaVallie E R, DiBlasio E A *et al*, 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. Nat Biotech, 11: 187—193
- Lim S, Ashida H, Watanabe R *et al*, 2011. Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts. Plant Mol Biol, 76: 335—344
- Lu J, Holmgren A, 2012. Thioredoxin system in cell death pro-

- gression. *Antioxid Redox Signal*, 1—10
- Masutani H, Ueda S, Yodoi J, 2005. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ*, 12(1): 991—998
- Mousallem T, Burks A W, 2011. Immunology in the clinic review series; focus on allergies: immunotherapy for food allergy. *J Trans Immunol*, 167: 26—31
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J, 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, 15: 351—369
- Pekkari K, Holmgren A, 2004. Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism. *Antioxid Redox Signal*, 6(1): 53—61
- Pigiet V P, Schuster B J, 1986. Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(20): 7643—7647
- Val G D, Yee B C, Lozano R M *et al*, 1999. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. *J Allergy Clin Immunol*, 103(4): 690—697
- Wilson W H, Schroeder D C, Allen M J *et al*, 2005. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus. *Science*, 309: 1090—1092
- Zhou J, Damdimopoulos A E, Spyrou G *et al*, 2007. Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia inducible factor 1 α . *Biol Chem*, 282(10): 7482—7490

EXPRESSION AND ACTIVITY ANALYSIS OF THIOREDOXIN (Trx) FROM MARINE COCCOLITHOPHORID *EMILIANA HUXLEYI* VIRUS IN *PICHIA PASTORIS*

CAI Yi-Qin, ZHANG Zhi-Lan, LUO Bang-Bin, LIU Jing-Wen
(College of Bio-Engineering, Jimei University, Xiamen, 361021)

Abstract Thioredoxin (Trx), a small molecule ubiquitous multifunctional acidic protein, was found to reduce disulfide bonds of protein (convert SOS to 2 SH) and thereby mitigate the allergenicity of food. *Emiliana huxleyi* virus (EhV) is the first virus containing Trx gene reported. Here the gene of EhV-Trx was amplified from the recombinant plasmid of pBS-EhV99B1-Trx by PCR. Ehv-Trx gene was inserted yeast expression vector pPIC9K to construct recombinant expression plasmid pPIC9K-EhV99B1-Trx. After sequencing, the recombinant expression plasmid was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation method. The recombinant protein EhV99B1-Trx reduction activity was detected. The results showed that: the open-reading frame (ORF) of EhV99B1-Trx encoded a protein of 197 amino acids; the recombinant EhV99B1-Trx was successfully induced expression in *P. pastoris* GS115 and the target protein molecular mass was about 27.8kDa; as found for other proteins with intramolecular disulfide bonds, insulin were reduced specifically by the recombinant EhV99B1-Trx and the treated product was relatively stable, which indicated that the EhV99B1-Trx, as a new kind of thioredoxin, do have the potential in food safety areas.

Key words *Emiliana huxleyi* virus (EhV), Thioredoxin (Trx), *Pichia pastoris*, Secreted expression, Activity analysis