

抗对虾白斑综合症病毒单链抗体 P1D3 基因在毕赤酵母中的分泌表达 Expression of Single Chain Fragment Variable P1D3 Antibody Against Shrimp White Spot Syndrome Virus in *Pichia pastoris*

杨 毅^{1,2} 张 敏^{1,2} 袁 丽^{1,2} 张晓华¹ 戴和平^{1*}

YANG Yi^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, YUAN Li^{1,2}, ZHANG Xiao-Hua¹ and DAI He-Ping^{1*}

1 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Institution of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 为了将可中和对虾白斑综合症病毒(WSSV)的单链抗体 P1D3 在酵母中实现表达,以原核表达载体 M13 噬菌粒为模板,设计带有 *Sna*B I 和 *Eco*R I 酶切位点的特异性引物,通过 PCR 方法扩增 P1D3 基因。经过酶切、连接反应将该基因连入大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pPIC9K 上。重组质粒 pPIC9K-scFvP1D3 经 *Bgl* II 线性化后,用电转化的方法转入毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 中。通过 PCR 和 DNA 测序,挑选和鉴定阳性克隆。经甲醇诱导, P1D3 在酵母中获得分泌表达。ELISA 实验结果表明,酵母表达上清液中的单链抗体具有较高的 WSSV 结合活性,而且其活性要高于大肠杆菌所表达抗体的活性。表达条件优化后,单链抗体在酵母中最高表达量可达 302mg/L,为开展对虾被动免疫研究提供了新的抗体来源。

关键词 毕赤酵母,对虾白斑综合症病毒(WSSV),单链抗体,分泌表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-0973-06

Abstract White spot syndrome virus(WSSV) is a major pathogen in aquaculture *penaeid* shrimp, which caused catastrophic economic losses in the worldwide. No adequate treatments against WSSV are available. In order to study infection mechanism of WSSV, a phage display scFv cDNA library against WSSV was constructed and a neutralizing antibody of scFv P1D3 was selected in our lab previously. In this study, scFv P1D3 was expressed successfully in yeast. Firstly, the original expression vector of P1D3, M13 phagmid, was used as a template to design primers with restriction sites of *Sna*B I and *Eco*R I. Then the gene of P1D3 was amplified by PCR. After digested by *Sna*B I and *Eco*R I, the fragment of scFv P1D3 with E-tag was inserted into yeast and *E. coli* shuttle plasmid pPIC9k. The recombinant plasmid pPIC9k-scFv P1D3-Etag was linearized with *Bgl* II and then transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Positive clones were selected and verified by PCR and DNA sequencing. The scFv P1D3 was induced to express in yeast by methanol. The results of ELISA demonstrate that scFv P1D3 expressed in yeast still has high specificity to bind on WSSV and the binding activity is higher than that expressed in *E. coli* TG1. After several optimizing experiments, the results show that the expression amount of scFv P1D3 can reach to 302mg/L in

Received: May 29, 2006; Accepted: July 26, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 30471339).

* Corresponding author. Tel: 86-27-68780716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

国家自然科学基金项目资助(No. 30471339)

yeast culture supernatant. This experiment has offered a new source of antibody for the researches on passive immunology for shrimp.

Key words *Pichia pastoris*, white spot syndrome virus (WSSV), single chain fragment variable (scFv), secreted expression

自 1993 年以来,对虾白斑综合症病毒(WSSV)在世界范围内给对虾养殖业造成了巨大损失。该病毒不仅对对虾具有高致病性,导致对虾 7 天内死亡率达 100%,对许多其他水生生物也具有感染力,如桡足类动物、海产蟹类、淡水对虾及蟹类等^[1,2]。目前对该病还没有较好的治疗方法,只能以预防为主。

为了探索 WSSV 的致病机理,我们研究小组构建了抗 WSSV 的单链抗体 cDNA 噬菌体展示文库,并从中获得了几十种特异识别 WSSV 的单链抗体。其中标号为 P1D3 的单链抗体,不论是在原代对虾细胞培养实验中,还是活体注射实验中,都表现出有较高的中和病毒的能力^[3]。由此设想,能否用这个单链抗体通过被动免疫的途径,增强对虾抗 WSSV 的能力。

单链抗体(scFv)是由抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)经一段柔软的短肽(linker)连接而成。它具有分子小,结构稳定,穿透性强,具备完整的抗原结合活性,很少或不会激起机体免疫应答等优点,并且还具有单链抗体基因操作方便、可在各种宿主细胞中表达的特点。这些优点使得单链抗体在疾病诊断和治疗方面具有较大的应用前景^[4]。

通过大肠杆菌表达系统制备抗体时,抗体中很可能会带入大肠杆菌成分,而大肠杆菌对环境和对虾本身有危害性。酵母可以作为对虾饲料的成分^[5],对环境和对虾是安全的。为了达到将单链抗体通过饲料途径引入对虾体内的目的,本实验尝试了将 P1D3 在毕赤酵母中进行表达。结果表明,我们成功地将 P1D3 在毕赤酵母中实现了表达。虽然已有一些有关单链抗体在毕赤酵母中表达的文章报道^[6-8],但由于每种单链抗体的氨基酸序列不同,对宿主细胞的毒性和对表达条件的要求都不同,因此本实验结果为这个方面的研究提供了新的实例和数据参考。

1 材料与方法

1.1 质粒

含单链抗体 P1D3 基因的噬菌粒载体 pCANTAB5E-scFv P1D3-Etag 由本实验室构建,克隆载体 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司,穿梭质粒载

体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.2 菌种及试剂

大肠杆菌 TG1, DH5 α 用于基因克隆实验,毕赤酵母 GS115(*P. pastoris* GS115)购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Sna*B I 和 *Eco*R I 为 NEB 公司产品, Taq DNA 聚合酶为 Biostar 公司产品, Pyrobest DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品, T4 DNA 连接酶、玻璃奶回收试剂盒以及碱性磷酸酶(CIAP)为 MBI 公司产品,小鼠 Anti-Etag/HRP conjugation 购自 Amersham-Pharmacia Biotech。酵母培养基 YPD, BMGY, BMMY, MD(含 1mol/L 山梨醇)平板具体配方见 Invitrogen 公司说明书。PBSM 为含 4% 脱脂牛奶的 PBS 溶液, PBST 为含 0.1% Tween 20 的 PBS 溶液。Western blot 反应底物 DAB 溶液组成: 10mL Tris-HCL(pH 7.6, 浓度 50mmol/L), 10 μ L H₂O₂, 6mg DAB。ELISA 底物 TMB 组成为: 0.1mol/L 醋酸钠溶液(pH 6), 1.5mg TMB(溶于二甲亚砜中), 10 μ L H₂O₂, 加蒸馏水至终体积 25mL。经严格定量过的、带有 Etag 标签的单链抗体 A1(蛋白 60 μ g/mL, 或单链抗体分子 1.9×10^{-3} mol/L)在本实验中作为单链抗体的定量标准,为本实验室制备^[9]。

1.3 单链抗体 P1D3 基因的扩增

设计带有 *Sna*B I 和 *Eco*R I 酶切位点的特异性引物, PCR 扩增包含标签 Etag 的 P1D3 片段。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成, 序列如下:

上游引物 p1: 5' cagtacgtaatggctgaggtcaagctgc 3'(画线部分为 *Sna*B I 酶切位点);

下游引物 p2: 5' ctagaattcacgcgggtccagcggatc 3'(画线部分为 *Eco*R I 酶切位点)。

PCR 反应体系: p1 和 p2 各 12pmol, dNTP 4nmol, 模板 pCANTAB5E-ScFv P1D3-Etag 0.3 μ g, Pyrobest DNA 聚合酶 0.25 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 10 \times Taq buffer 5 μ L, 加去离子水至反应体系 50 μ L。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min(1 个循环), 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min(30 个循环); 最后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min。PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定效果, 切下目的条带, 用玻璃奶方法进行回收和纯化。

1.4 P1D3 基因的克隆及鉴定

PCR 扩增片段经纯化后连入 pMD18-T 载体,用 CaCl_2 法转化大肠杆菌 DH5 α ,涂布到氨苄青霉素选择培养基平板上。PCR 挑选阳性克隆。重组质粒 pMD18-T-P1D3-Etag 经纯化后,用 *EcoR* I 和 *Sna* B I 双酶切纯化回收,然后克隆于经同样酶切的 pPIC9K 载体中,具体反应条件见 NEB 公司产品说明书。连接产物用 CaCl_2 法转化大肠杆菌 DH5 α ,从氨苄青霉素选择平板中挑取单菌落,用 PCR 方法初步鉴定阳性重组子 pPIC9K-scFvP1D3-Etag,并送到北京奥科生物技术有限责任公司测序鉴定。

1.5 重组子 pPIC9K-scFvP1D3-Etag 转化酵母及诱导表达

将含有目的基因的重组子经限制性内切酶 *Bgl* II 线性化后,电转化毕赤酵母 GS115,电转化参数为电压 1500V,电容 25 μF ,电阻 200 Ω ,具体操作方法见 Invitrogen 公司产品使用说明书。转化涂平板后,30 $^{\circ}\text{C}$ 经 4~5d 可得到转化子。玻璃珠法提取酵母 DNA,挑选 PCR 阳性转化子,在 28 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行甲醇诱导表达,步骤按照 Invitrogen 公司产品使用说明书进行。

1.6 酵母表达上清液的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

经饱和硫酸铵浓缩过的酵母表达上清液 20 μL ,按常规方法进行 SDS-PAGE 分析,分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%,恒定电压 150V;另外,将分离胶的蛋白条带电转移到硝酸纤维素膜上,电转移条件为恒定电流 100mA,持续时间 60min,然后将膜用 PBMS 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 1h,PBS 洗膜 3 次,将膜浸入用 PBMS 稀释 10 000 倍的 Anti-Etag/HRP conjugation 中 1h,再用 PBST 和 PBS 各洗膜 3 次,随后将膜浸入到底物 DAB 溶液中显色。

1.7 表达产物活性的 ELISA 检测

将实验室提取的 WSSV 先用 PBS 稀释 100 倍(含 0.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 病毒蛋白)后,再将稀释液进行倍比稀释,然后包被 96 孔 ELISA 板。每孔加入 WSSV 稀释液 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。将包被过夜的 96 孔板用 PBS 清洗 3 次后,用 PBMS 封闭孔板,30 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1h;接着分别用 PBST 和 PBS 先后清洗平板 3 次,每孔加入浓缩后的 P1D3 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1h;用 PBST 和 PBS 分别清洗平板 3 次后,加入用 PBMS 稀释 10 000 倍的二抗 Anti-Etag/HRP conjugation 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1h;再用 PBST 和 PBS 分别清洗平板 3 次,加入反应底物 TMB 溶液,常温反应 15min 后,每孔加入

25 μL 浓度为 2mol/L 的 H_2SO_4 终止反应,测定 OD_{450} 吸收值。

将在毕赤酵母和大肠杆菌 TG1 中分别表达的单链抗体 P1D3,经 PBS 稀释后调整二者标签 Etag 的量一致,然后检测它们对 WSSV 的结合活性。WSSV 的包被量是每孔加入 0.9 μg 病毒蛋白,其余步骤如上。

1.8 诱导条件对 P1D3 表达的影响及其表达量的测定

本试验主要依照文献[10]做了以下尝试:30 $^{\circ}\text{C}$ 下,诱导前先用含有 0.35mol/L 醋酸钾的 BMGY 培养基培养酵母,以考察诱导前酵母细胞经渗透压处理对单链抗体表达的影响;尝试在诱导培养基 BMMY 中加入 EDTA(终浓度 5mmol/L),或用浓度(V/V)1% 甲醇进行诱导;15 $^{\circ}\text{C}$ 下,用 0.5% 或 1% 浓度(V/V)的甲醇诱导表达。表达上清液做 SDS-PAGE 分析,同时用 ELISA 检测抗体表达水平,二抗为小鼠 Anti-Etag/HRP conjugation,反应底物为 TMB,具体做法如上。

用已知蛋白量的单链抗体 A1 作为标准蛋白,稀释 40 倍后,再进行倍比稀释,以单链抗体 A1 的蛋白量对其所带的标签 Etag 的 ELISA 测定值做标准曲线。将各种不同条件下酵母表达上清液用 PBS 稀释 100 倍后,再接着进行倍比稀释。用 ELISA 方法测定 Etag 值,根据 A1 的标准曲线,计算单链抗体 P1D3 的表达量。

2 结果

2.1 单链抗体 P1D3 基因的克隆及验证

以实验室构建的质粒 pCANTAB5E-scFv P1D3-Etag 为模板,P1 和 P2 作为上下游引物,PCR 扩增 scFv-Etag 全长基因。将扩增产物连入 pMD18-T 载体。再先后用 *EcoR* I 和 *Sna* B I 切下目的片段,将酶切产物连入经过 *Sna* B I 和 *EcoR* I 酶切过的载体 pPIC9K,转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 检测阳性结果见图 1。图中显示,阳性克隆的 PCR 产物的分子量约为 800bp,与阳性对照相当,说明 scFv P1D3-Etag 基因片段已成功插入到 pPIC9K 载体中。图 1 中,阴性对照为 PCR 体系中未加模板 DNA,阳性对照模板为 pCANTAB5E-scFv P1D3-Etag,其他条件相同。

提取阳性克隆质粒,经 *Bgl* II 线性化后,电转化毕赤酵母 GS115。用玻璃珠方法提取酵母 DNA,PCR 检测阳性重组子,结果见图 2。图中显示,阳性克隆的 PCR 产物的分子量约为 800bp,与阳性对照

相当,说明 scFv P1D3-Etag 基因片段已成功插入到酵母的基因组中。DNA 测序结果也表明 PCR 所扩增的片段与 scFv P1D3-Etag 基因片段完全相同,读码框也正确。图 2 中的对照与图 1 相同。

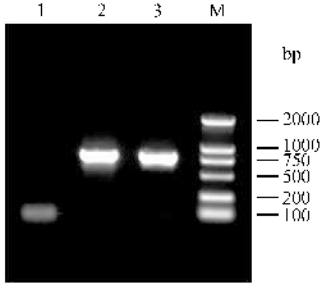


图 1 重组质粒在大肠杆菌 DH5α 阳性克隆中的 PCR 鉴定
Fig.1 Identification of recombinant plasmid in DH5α positive colonies by PCR

1: negative control; 2: positive control; 3: positive colony; M: DL2000 marker.

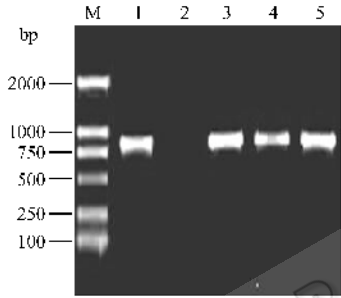


图 2 重组基因插入到酵母阳性克隆基因组中的 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of recombinant gene fragment inserted in genome of yeast positive colonies by PCR

M: DL2000 marker; 1: positive control; 2: negative control; 3~5: positive colonies.

2.2 单链抗体 P1D3 基因的初步表达

挑选其中一个酵母阳性克隆依照 Invitrogen 公司说明书在 30℃ 下培养,摇床转速 200r/min,每隔 24h 补加 0.5% 甲醇,每天取样 1mL,2~6d 后收获。SDS-PAGE 分析基因表达情况。从图 3 中可以看出,在分子量约 31kD 处,有一条明显的蛋白条带出现,与单链抗体 P1D3 的分子量相符,而在阴性对照的泳道上却看不到这样一条蛋白带,结果说明单链抗体 P1D3 在这种条件下成功获得了表达。图 4 的 Western blot 分析结果进一步证明,诱导表达所出现的 31kD 的蛋白条带是带有 E-tag 的单链抗体 P1D3。

2.3 诱导条件的优化

对如下几种诱导条件进行了尝试:(1)30℃下,用浓度 1%(V/V)甲醇进行诱导;(2)30℃下,诱导前将毕赤酵母在含有 0.35mol/L 醋酸钾的 BMGY 培

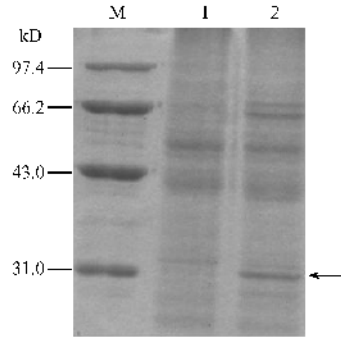


图 3 P1D3 诱导表达酵母培养上清液的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 Analysis of induced expression of P1D3 in supernatant of yeast culture by SDS-PAGE

M: marker; 1: pPIC9K-GS115 as negative control; 2: supernatant of induced expression.

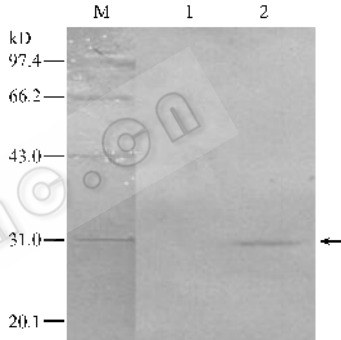


图 4 P1D3 诱导表达酵母培养上清液的 Western-blot 分析
Fig.4 Analysis of induced expression of P1D3 insupernatant of yeast culture by Western-blot

M: marker; 1: pPIC9K-GS115 as negative control; 2: supernatant of induced expression.

养基中生长至 OD_{600} 值 2~6 后,再用 0.5% 甲醇诱导(3)30℃下,用 0.5% 甲醇诱导时,在培养基 BMMY 中加入 5mmol/L EDTA (4)30℃下,在含有 0.35mol/L 醋酸钾的 BMGY 培养基中培养细胞后转入到含有 5mmol/L EDTA BMMY 中,以 0.5% 甲醇诱导(5)15℃低温下,用 0.5% 和 1% 甲醇分别进行诱导表达。表达上清液中的单链抗体的蛋白量的测定按“材料与方法”中所述,具体结果见图 5。从图中可以看出,酵母细胞诱导前经醋酸钾处理,诱导时培养基添加 EDTA,以及 15℃低温诱导表达,都可以较大幅度的增加目的蛋白的表达量。在 30℃下,酵母细胞经过 0.35mol/L 醋酸钾处理,转入到添加 EDTA 的 BMMY 中,经 0.5% 浓度甲醇诱导后,最大表达量可达 302mg/L。

在 15℃下,酵母分别经过浓度为 0.5% 和 1% 甲醇诱导后,表达产物的 ELISA 结果见图 6。从图中可以看出,两种诱导条件下 P1D3 都得到了表达,且

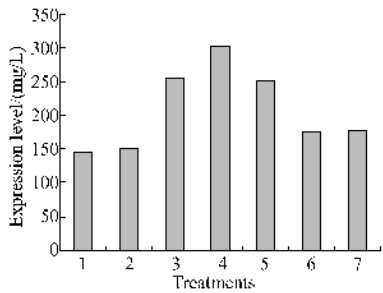


图 5 P1D3 在不同诱导条件下的表达量

Fig.5 Analysis of the expression level of P1D3 under different inducing conditions

1 :30℃ ,induced by 0.5% methanol ;2 :30℃ ,induced by 1% (V/V) methanol ;3 :30℃ ,pre-induced with KOAc ;4 :30℃ ,pre-induced with KOAc ,and then induced with additional EDTA ;5 :30℃ ,induced with additional EDTA ;6 :15℃ ,induced by 0.5% methanol ;7 :15℃ ,induced by 1% methanol .

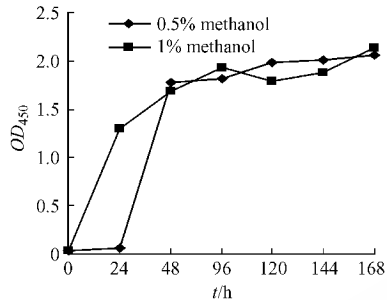


图 6 15℃下 P1D3 经不同浓度甲醇诱导后其表达水平与诱导时间的关系

Fig. 6 The relationship between expression level of P1D3 induced by different concentrations of methanol and inducing time under 15℃

产物水平较稳定。但是 ,在 1% 浓度甲醇诱导下 ,抗体经过 24 h 诱导后即获得了大量表达 ,而经 0.5% 甲醇诱导后 ,抗体表达在 24 h 时还没有启动 ,要经过 48h 才开始大量表达。

2.4 酵母表达的单链抗体 P1D3 与 WSSV 结合活性的检测

将酵母表达的 P1D3 对不同量病毒蛋白和健康虾血清作 ELISA 分析 ,结果见图 7。从图中可以看出 ,酵母表达的 P1D3 仍然具有很高的与 WSSV 结合的特异性 ,ELISA 值随着 WSSV 蛋白浓度的增加而增高 ,而与健康对虾血淋巴液不发生反应。

将在毕赤酵母和大肠杆菌 TG1 中分别表达的单链抗体 P1D3 经 PBS 稀释后调整二者标签 Etag 的量一致 ,然后检测它们对 WSSV 的结合活性。WSSV 的包被量是每孔加入 0.9μg 病毒蛋白。如图 8 结果所示 ,在毕赤酵母中表达的单链抗体 P1D3 的 WSSV 结合活性大大高于其在大肠杆菌中表达产物的活

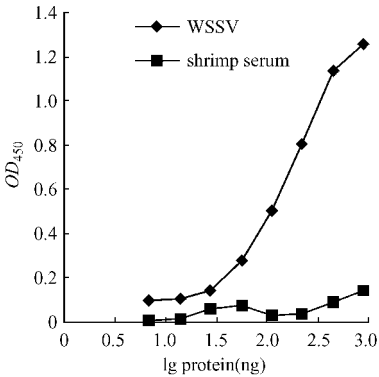


图 7 ELISA 检测酵母表达的单链抗体 P1D3 与 WSSV 的结合活性

Fig. 7 ELISA assay for binding specificity to WSSV by scFv P1D3 expressed in yeast

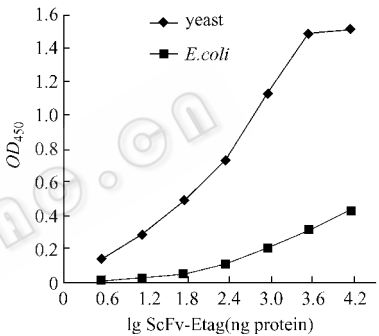


图 8 P1D3 分别在毕赤酵母和大肠杆菌中表达后抗体的 WSSV 结合活性比较

Fig. 8 Comparison for the activity of scFv P1D3 binding to WSSV expressed in *P. pastoris* with that in *E. coli*

性 ,其原因将在讨论部分详细说明。

3 讨论

对虾是无脊椎动物 ,不具备特异性、可记忆性的免疫系统 ,不能产生抗体 ,因此对对虾病毒病的防治不能像脊椎动物那样 ,通过接种疫苗获得特异性抵抗病毒的能力^[11]。被动免疫不妨是另一种可以尝试的研究途径。目前已有很多研究报道 ,证明用抗体与 WSSV 在体外保温后 ,再注射到对虾体内 ,可以中和病毒感染的活力^[12-14]。但在对虾养殖实践中 ,靠注射将抗体引入对虾体内是不可行的。而通过饵料途径将抗体引入对虾体内却是另外一种可以尝试的方式。单链抗体 P1D3 原初的表达宿主是大肠杆菌 ,然而大肠杆菌不是对虾的饵料 ,对环境也有害 ,因此本实验的目的是将 P1D3 基因转到可作为对虾饵料的酵母中 ,并实现表达。

本实验选择了 Invitrogen 公司的毕赤酵母作为宿主细胞。毕赤酵母自从上个世纪 70 年代被开发

用作蛋白表达系统以来,经过不断的完善,已经成为一种高效表达外源蛋白的重要的宿主细胞。毕赤酵母具有生长快、易操作、表达量高、培养条件简单、耗费低廉的特点。本实验中表达的单链抗体 P1D3 仍然具有识别 WSSV 的特异性,而且与大肠杆菌相比,其结合病毒的活性要大大高于大肠杆菌系统表达产物。这可能是由于所用大肠杆菌表达菌株是 TG1,这个菌株对琥珀终止子的识别效率只有 20%,因此很大一部分单链抗体是与噬菌体的 P3 蛋白融合表达的^[14],这种融合蛋白虽然也带有标签 Etag,但可能没有与 WSSV 结合的活力^[9]。酵母表达系统不存在单链抗体与噬菌体 P3 蛋白的融合,再加上真核修饰作用使得抗体在分泌过程中得到了更好的修饰折叠,从而表现出更高的生物活性。

本实验还尝试用几种方法来提高 P1D3 的表达水平。结果发现低温诱导、高渗环境处理(醋酸钾)诱导前细胞以及诱导培养基中加入 EDTA 对提高蛋白表达量具有明显的促进作用。甲醇浓度对表达量影响不大,但是 ELISA 结果显示,15℃ 下,用 1% 甲醇浓度诱导表达经过 24 h,抗体表达已经达到较高值并在随后的过程中保持稳定,浓度 0.5% 甲醇诱导下蛋白表达要推迟 24 h。虽然低温对表达具有促进作用,但是在低温条件下酵母生长较慢,且低温条件耗费大,对于实际生产不太实用。所以,我们最终选择 30℃ 下,酵母细胞经过醋酸钾处理后,再用含有 EDTA 的 BMMY(含 0.5% 甲醇)进行诱导。诱导表达上清液中抗体的最高表达量约为 302mg/L。

本实验结果为开展对虾被动免疫研究提供了新的抗体来源,为大规模制备抗对虾白斑综合症中和抗体摸索了一些条件。与原核表达相比,酵母可表达具有较高生物活性的抗体 P1D3,其病毒中和能力是否也有很大提高,还有待于进一步确定。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Xie XX, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, **336**(1): 93–99
- [2] Sathish S, Selvakkumar C, Sauhil Hameed AS *et al.* 18-kDa protein as a marker to detect WSSV infection in shrimps.

Aquaculture, 2004, **238**: 39–50

- [3] Yuan L, Zhang XH, Xiao N, Dai LF, Chen WZ, Jia CS, Zhao RH, Hemmingsen SM, Dai HP. Identification of a WSSV neutralizing scFv antibody by phage display technology and *in vitro* screening method. *Des Aqua Org*, 2006, in press
- [4] Damasceno LM, Pla I, Chang HJ *et al.* An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif*, 2004, **37**: 18–26
- [5] Wang XC(王兴春), Wang CS(王初升). Application of yeast additives in feed to artificial seed breeding of *Penaeus vannamei* and *P. japonicus*. *Marine Fisheries* (海洋渔业), 2002, **24**(1): 20–22
- [6] Patrick SM, Fazenda ML, McNeil B *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**: 249–270
- [7] Wang H(王宏), Jin NY(金宁一), Yin GF(尹革芬) *et al.* Expression and detection of recombinant directing toxin SL120 in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**: 473–477
- [8] Xiong S(熊盛), Ren XR(任向荣), Tang YH(唐永红) *et al.* Expression of a human single chain Fv antibody against HBsAg in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**: 19–23
- [9] Zhang XH(张晓华), Dai LF(戴玲芬), Dai HP(戴和平). Studies on expression and biochemical characteristics of single chain fragment variable A1 against white spot syndrome virus of shrimp. *Acta Hydrobiologica Sinica* (水生生物学报), 2006, **30**: 141–145
- [10] Shi XZ, Karkut T, Chamankhah M *et al.* Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody(scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif*, 2003, **28**: 321–330
- [11] Soderhall K, Cerenius L. Crustacean immunity. *Annu Rev Fish Dis*, 1992, pp. 3–23
- [12] Li HX, Meng XL, Xu JP *et al.* Protection of crayfish, *Cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein. *J Fish Dis*, 2005, **28**(5): 285–291
- [13] Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus(WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. *Virology*, 2005, **332**(2): 578–583
- [14] Huang R, Xie Y, Zhang J *et al.* A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection. *J Gen Virol*, 2005, **86**(Pt5): 1357–1361