

文章编号: 1674-5566(2010)01-0001-06

新加坡石斑鱼虹彩病毒 ORF086蛋白的原核表达、纯化及抗体制备

夏立群^{1,2}, 张红莲^{1,2}, 梁海鹰^{1,3}, 刘森林¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要:新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus SG IV) 是导致石斑鱼养殖严重经济损失的主要病原体。本研究构建了含有新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus SG IV) ORF086 基因的重组表达质粒载体 pET32a-ORF086, 将其转化到大肠杆菌中进行融合表达, 经 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定, 证实重组大肠杆菌融合表达了 SG IV ORF086 蛋白。经异丙基- β -D 硫代半乳糖苷 (isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside IPTG) 浓度、诱导温度、诱导时间等诱导表达条件的优化, 确定在 0.7 mmol/L IPTG、16 °C 诱导 14 h 时, 可溶性 SG IV ORF086 重组蛋白占重组蛋白的 60%。经镍琼脂糖凝胶柱纯化重组蛋白, 纯化度达 95% 以上。用纯化的 SG IV ORF086 蛋白免疫小鼠, 获得了高效特异的 SG IV ORF086 抗血清。

关键词:新加坡石斑鱼虹彩病毒; 原核表达; 多克隆抗体; SG IV ORF086 重组蛋白

中图分类号: Q 786; S 917 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression, purification and antibody preparation of SG IV ORF086 protein

XIA Li-qun^{1,2}, ZHANG Hong-lian^{1,2}, LIANG Hai-ying^{1,3}, LIU Sen-lin¹

(1. College of Ocean & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Singapore grouper iridovirus (SG IV) is a major pathogen resulting in heavy economic losses to grouper aquaculture. In this study, recombinant expression vector pET32a-ORF086 inserted with SG IV ORF086 gene is transformed into *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE and Western blot analysis confirm that the transformed *E. coli* BL21 can express SG IV ORF086 recombinant protein. The soluble recombinant protein is highly expressed under induction conditions of exposure to IPTG (0.7 mmol/L) at 16 °C for 14 h and successfully purified by Ni-NTA His-Bind affinity column with above 95% purity. The polyclonal antibody is prepared by immunizing mice with purified SG IV ORF086 protein and proved to be specific against SG IV ORF086 protein.

Key words: Singapore grouper iridovirus (SG IV); prokaryotic expression; polyclonal antibody; SG IV

收稿日期: 2009-09-10

基金项目: 广东省自然科学基金 (06104920)

作者简介: 夏立群 (1976-), 女, 博士, 讲师, 主要从事海洋生物学方面的研究。E-mail: xql101@yahoo.com.cn

ORF086 recombinant protein

新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus SG IV) 是近年来新发现的一种严重的鱼类传染性病毒^[1-2]。目前 SG IV 的分离鉴定、分子分类、基因组学、转录组学、蛋白组学及快速检测方法等相关基础研究已经完成^[3-6], 对 SG IV 重要功能基因的研究正陆续展开^[7-8]。SG IV 的基因根据转录的先后顺序可以分为 3 个时期: 立即早期 (immediate-early IE)、早期 (early E) 和晚期 (late L)^[5]。IE 基因的转录出现在病毒 DNA 复制之前, 并在病毒感染复制、宿主细胞生长调控和免疫逃避等方面具有重要功能^[9-11]。对 SG IV 立即早期基因的功能及其相互作用中的细胞和分子机制的研究, 将有助于进一步阐明 SG IV 的感染致病机制, 并为疾病的防治提供理论依据。

ORF086R 是 SG IV 全基因组转录图谱确定的一个立即早期基因^[5], 通过生物信息学分析, 发现这个基因与感染细胞多肽 ICP18 (infected cell polypeptides 18) 具有较高同源性。ICP18 是虹彩病毒科蛙病毒属特有的核心基因之一, 并可能在蛙病毒属的生命周期中具有重要作用, 但目前 ICP 18 家族的功能尚不明确。本文将 SG IV ORF086 基因在大肠杆菌中进行了融合表达、蛋白纯化和抗体制备, 为进一步研究 SG IV ORF086 的功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株和质粒

新加坡石斑鱼虹彩病毒 (SG IV)、表达载体 pET-32a、表达受体菌 BL21 (DE3) 由中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室提供。

1.1.2 工具酶和试剂

PrimeSTAR DNA 聚合酶, 限制性核酸内切酶 EcoR I, Xho I, T₄ 连接酶, DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; 质粒微量提取试剂盒购自 U-gene 公司; 异丙基- β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 BBI 公司; BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒购自上海申能博采公司; His-Tag 单克隆抗体购自 Tiangen 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Boster 公司; 5 mL 镍琼脂糖凝胶预成柱购自北京韦氏博

慧色谱科技有限公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SG IV 总 DNA 的提取

取适量 SG IV 病毒悬液, 加入等体积的碱裂解缓冲液, 37℃ 作用 15 min 至病毒悬液变得较为澄清, 再加入等体积的 2% SDS 和 25 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 50℃ 作用 30 min 至病毒悬液完全澄清, 12 000 r/min 离心 5 min 除去碱裂解不溶物。吸取上清, 用酚、酚氯仿 (1:1) 与酚氯仿异戊醇 (25:24:1) 依次轻柔抽提, 上清用 2.5 倍体积的 95% 冰乙醇沉淀病毒 DNA, 12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用冰冷的 70% 乙醇洗涤 2 次, 12 000 r/min 离心 1 min, 沉淀溶于 TE 缓冲液后, -20℃ 保存。

1.2.2 SG IV ORF086 基因的克隆

根据 SG IV (accession number AY521625) ORF086 (nucleotide position: 80591-81055) 的序列和质粒 pET-32a MCS 酶切位点设计引物如下。上游引物 P1: 5'-GCGGAATTCACACTAC-CAAACACCATG-3' (EcoRI); 下游引物 P2: 5'-GCGCTCGAGTTAAACC-CCTTGGATGG-3' (Xho I) 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s 共 30 个循环, 再 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物经 DNA 片段纯化试剂盒纯化, 酶切后以摩尔数比 1:3 (载体: 插入片段) 的比例克隆入 pET-32a 载体, 蓝白斑筛选阳性克隆, 菌落 PCR 和双酶切鉴定后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 大肠杆菌 BL21/pET32a-ORF086 重组菌的获得

提取重组表达载体 pET32a-ORF086 的质粒 DNA, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 次日挑取转化 LB 平板 (含 Amp¹⁰⁰ μ g/mL) 上长出的单菌落, 即为含 SG IV ORF086 基因的原核重组菌 BL21/pET32a-ORF086。

1.2.4 融合蛋白表达及表达条件优化

挑取转化平板上长出的阳性菌落于 LB 液体培养基 (含 Amp¹⁰⁰ μ g/mL) 中 37℃ 活化过夜, 次日按照 1% (V/V) 的比例转接于新鲜的 LB 液

体培养基(含 Amp¹⁰⁰ μg/mL)中,培养至 A₆₀₀约为 0.6~1.0时,加入 100 mmol/L IPTG至终浓度为 1 mmol/L继续培养 4 h。取培养后的菌液 1 mL 10 000 r/min离心 1 min收集菌体,进行 SDS-PAGE分析。其他条件不变的情况下,在不同的 IPTG浓度(0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.7 mmol/L和 1 mmol/L)、不同的温度(37℃、28℃、22℃、16℃)、不同的诱导时间(8 h、10 h、12 h、14 h、16 h)下诱导,分别离心收集菌体并超声破碎,将离心后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE分析。

1.2.5 表达产物的纯化

每克表达菌沉淀湿重用 5 mL Bind Buffer (500 mmol/L NaCl 50 mmol/L PBS 100 mmol/L 咪唑, pH7.4)的比例重悬,超声波破碎后离心,取上清加入到 5 mL镍琼脂糖凝胶预成柱中,以 0.5 mL/min的流速过柱,收集流出物;用 10倍柱体积 Wash Buffer (500 mmol/L NaCl 50 mmol/L PBS 100 mmol/L 咪唑, pH7.4)洗脱杂蛋白,以 1 mL/min的流速过柱,收集流出物;用 Elute Buffer (500 mmol/L NaCl 50 mmol/L PBS 400 mmol/L 咪唑, pH7.4)洗柱 3次,每次 1.5倍柱体积,分别收集流出物。每次收集物均取 30 μL进行 SDS-PAGE分析。纯化蛋白液放于 -20℃保存。

1.2.6 抗血清的制备

将纯化的 ORF086融合蛋白,腹腔皮下多点注射免疫 SPF级小鼠。每只小鼠每次免疫约 30 μg ORF086融合蛋白,以注射佐剂加 PBS为阴性对照。每隔 7 d免疫一次,共免疫 4次。首次注射的抗原为蛋白或 PBS与完全佐剂 FCA混匀制备,之后 3次注射的抗原均采用蛋白或 PBS与不完全佐剂 FIA混匀制备。末次加强免疫后 1周眼球取血,离心分离血清, -80℃保存。

1.2.7 抗血清效价测定和特异性检测

用纯化的重组蛋白为抗原包被 96孔板,浓度约每孔 10 μg。待测鼠抗血清为一抗,按 1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:12 000、1:16 000、1:20 000、1:24 000、1:32 000比例稀释待测血清,注射佐剂加 PBS的阴性血清以 1:1 000稀释作为对照,HRP标记的羊抗鼠的 IgG为二抗,四甲基联苯胺(TMB)溶液显色后酶标仪测定抗体效价。将诱导表达的重组菌进行 SDS-PAGE电泳后,70 mA转印约 2 h将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%

脱脂牛奶 4℃封闭过夜。加入一抗(鼠抗 SG IV ORF086血清, 1:5 000稀释),对照采用阴性血清。TBST (20 mmol/L Tris-HCl 150 mmol/L NaCl 0.05% (V/V) Tween 20, pH7.4)清洗后加入二抗(HRP标记的羊抗鼠 IgG, 1:1 000稀释),TBST清洗,最后加入 DAB显色液,待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

2 结果

2.1 SG IV ORF086基因的克隆

高保真 PCR扩增得到一条约 500 bp的特异条带(图 1),克隆入 pET-32a载体,经菌落 PCR和 EcoRI/XohI双酶切鉴定,证明获得了阳性克隆,经测序后发现该克隆插入片段的序列与全基因组测序报导的 SG IV ORF086序列完全一致。该基因含有一个 465 bp的开放读码框(ORF),编码 154个氨基酸,预测分子量约为 17.1 ku等电点为 8.08。

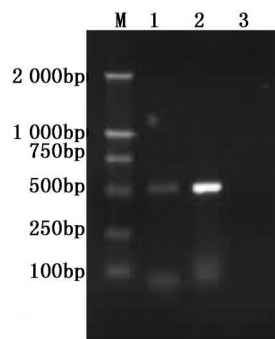


图 1 SG IV ORF086基因 PCR扩增电泳结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of SG IV ORF086 gene

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. SG IV ORF086 的高保真 PCR 产物; 2. 普通 Taq酶阳性对照; 3. 阴性对照。

2.2 SG IV ORF086的原核表达

将 pET32a-ORF086质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)得到 BL21/pET32a-ORF086重组菌,发现经 IPTG诱导后,与未经诱导重组菌全菌蛋白电泳条带相比,在约 37.5 ku处有一条超强蛋白带,与预期相符,说明了 ORF086融合蛋白成功表达。同时以诱导的含未重组质粒 pET32a的 BL21 (DE3)菌体作对照,在约 20.4 ku的位置有很强的蛋白带(图 2)。His-Tag单克隆抗体进行 Western blot检测也表明带 his标签的 ORF086融合蛋白表达成功(图 3)。

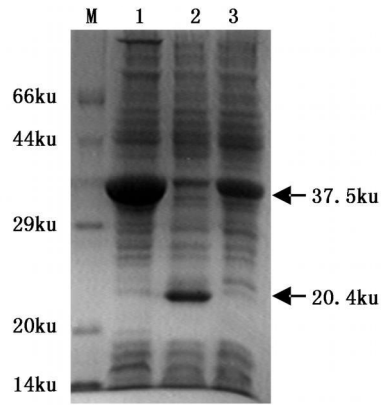


图 2 pET32a-ORF086在大肠杆菌中表达 SDS-PAGE分析

Fig 2 SDS-PAGE of SG IV ORF086 expressed in *E. coli* BL21(DE3)

M: 低分子标准蛋白; 1: BL21/pET32a-ORF086经诱导全菌蛋白; 2: BL21/pET32a经诱导全菌蛋白; 3: 未经诱导的BL21/pET32a-ORF086全菌蛋白。

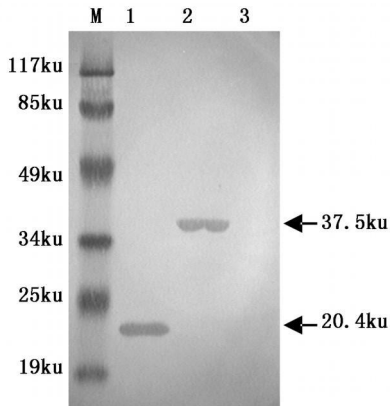


图 3 用 His Tag 单克隆抗体对 pET32a-ORF086 在大肠杆菌中的表达进行 Western blot 分析

Fig 3 Western blot analysis using the His Tag monoclonal antibody of SG IV ORF086 expressed in *E. coli* BL21(DE3)

M: 预染标准分子量蛋白; 1: BL21/pET32a经诱导全菌蛋白; 2: BL21/pET32a-ORF086经诱导全菌蛋白; 3: 未经诱导的BL21/pET32a-ORF086全菌蛋白。

2.3 SG IV ORF086表达条件的优化

通过调节 IPTG 诱导浓度、诱导温度和诱导时间,对 SG IV ORF086 的表达条件进行了优化。发现在其他条件一致的情况下,0.7 mmol/L IPTG 诱导的融合蛋白相对最多(图 4)。对不同诱导温度下 ORF086 融合蛋白的表达量及其可溶性的研究显示,随诱导温度的升高,融合蛋白的表达量

增高,但是随诱导温度的升高,上清中可溶性目的蛋白的比例有所减少(图 5)。用 GelPro 3.1 对图 5 进行蛋白条带分析,发现 37℃ 诱导时,可溶性蛋白占重组蛋白的 40%,16℃ 诱导时可溶性蛋白约占重组蛋白的 60%。诱导温度对 ORF086 融合蛋白可溶性的影响较为明显。比较了 0.7 mmol/L IPTG 在 16℃ 下 5 个诱导时间的表达量,表明在 14 h 以内,随诱导时间的增长,重组蛋白的表达量增高,诱导 14 h 以上,表达量与诱导 14 h 的表达量相当(图 6)。最终确定 ORF086 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达条件为:0.7 mmol/L IPTG、16℃ 诱导 14 h。

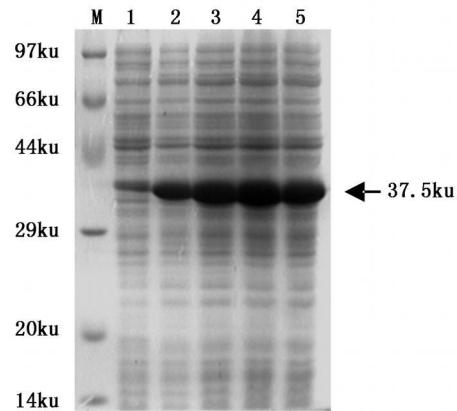


图 4 重组菌 BL21/pET32a-ORF086 在不同 IPTG 浓度诱导表达 ORF086 的 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of ORF086 expression at different concentration of IPTG

M: 低分子量标准蛋白; 1: BL21/pET32a-ORF086 未诱导全菌蛋白; 2-5: 分别为 0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.7 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 诱导的 BL21/pET32a-ORF086 全菌蛋白。

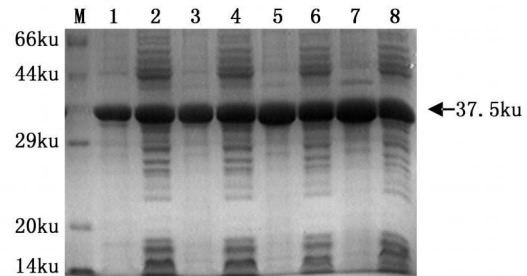


图 5 重组菌 BL21/pET32a-ORF086 在不同温度诱导表达 ORF086 可溶性的 SDS-PAGE 分析

Fig 5 SDS-PAGE analysis of solubility of ORF086 at different induced temperature

M: 低分子量标准蛋白; 1: 16℃ 诱导沉淀; 2: 16℃ 诱导上清; 3: 22℃ 诱导沉淀; 4: 22℃ 诱导上清; 5: 28℃ 诱导沉淀; 6: 28℃ 诱导上清; 7: 37℃ 诱导沉淀; 8: 37℃ 诱导上清。

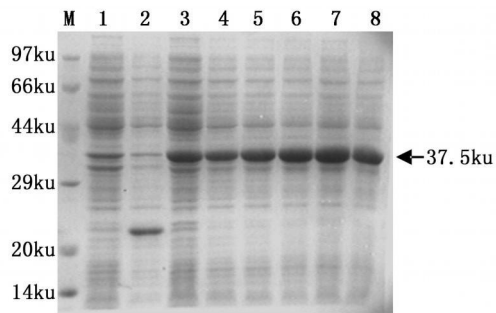


图 6 重组菌 BL21/pET32a-ORF086 诱导不同时间的 SDS-PAGE 分析

Fig 6 SDS-PAGE analysis of expression of BL21/pET32a-ORF086 at different induced time

M. 低分子量标准蛋白; 1. BL21/pET32a 未诱导 8 h; 2. BL21/pET32a 诱导 8 h; 3. BL21/pET32a-ORF086 未诱导 8 h; 4-8 分别为 BL21/pET32a-ORF086 诱导 8 h, 10 h, 12 h, 14 h 和 16 h.

2.4 SG IV ORF086 融合蛋白的纯化及定量

以含 100 mmol/L 咪唑的 Wash Buffer 洗脱杂蛋白后,再以 1.5 倍柱体积含 400 mmol/L 咪唑的 Elute Buffer 洗脱三次,获得了良好的纯化效果,如图 7 所示,融合蛋白的纯化度可达 95% 以上。用 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒测定, Elute Buffer 洗脱第一次、第二次和第三次收集液中纯化的 ORF086 融合蛋白浓度分别为 1.013、0.8、133.26、13.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

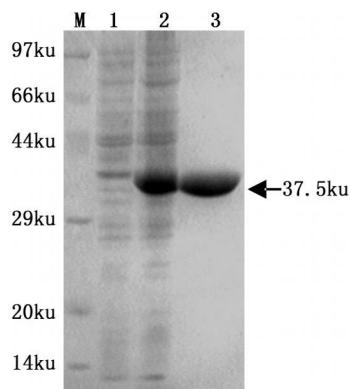


图 7 SDS-PAGE 分析 ORF086 融合蛋白纯化的结果

Fig 7 SDS-PAGE analysis of ORF086 purification product

M. 低分子量标准蛋白; 1. BL21/pET32a-ORF086 未诱导全菌蛋白; 2. BL21/pET32a-ORF086 诱导全菌蛋白; 3. 纯化后的 ORF086 融合蛋白。

2.5 SG IV ORF086 抗血清的制备和检测

间接 ELISA 法检测表明获得的 SG IV ORF086 抗血清效价为 1:24 000。用 SG IV ORF086 抗血清和阴性血清对 BL21/pET32a-ORF086 诱导全菌蛋白进行 Western blot 分析,发现 SG IV ORF086 抗血清检测到一条 37.5 ku 的蛋白条带(图 8 A),而注射佐剂与 PBS 的阴性血清没有检测到蛋白条带(图 8 B),说明所制备的 SG IV ORF086 抗血清可以与 37.5 ku 的 ORF086 重组蛋白发生特异性反应。

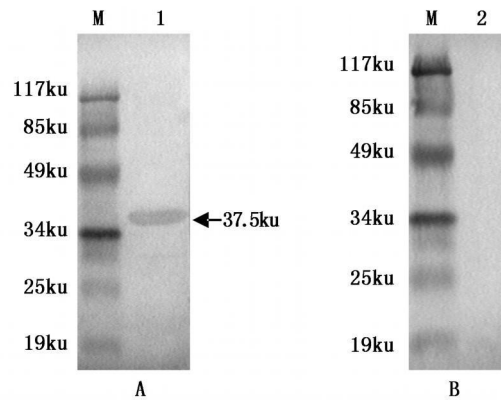


图 8 ORF086 抗血清的 Western blot 分析

Fig 8 Western blot analysis of anti-ORF086 fusion protein serum

M. 预染标准分子量蛋白; 1. SG IV ORF086 抗血清; 2. 阴性血清。

3 讨论

有关 ICP18 (infected cell protein 18) 的报道最早见于 20 世纪 80 年代对蛙病毒属 (Ranavirus) 代表种蛙病毒 3 型 (frog virus 3, FV-3) 的研究,是最早进行序列测定的 FV-3 基因^[12]。其后在其他蛙病毒属病毒中也陆续发现了 ICP18 同源类似物的存在。同源搜索表明 ICP18 同源类似物目前只在蛙病毒属病毒中发现,在已全基因测序的 6 种蛙病毒 FV-3、虎纹蛙病毒 (Tiger frog virus TFV)、虎纹蝾螈病毒 (Ambystoma tigrinum virus ATV)、SG IV、石斑鱼虹彩病毒 (Groupers iridovirus G IV) 和中华鳖虹彩病毒 (Soft-shelled turtle iridovirus STIV) 中都发现了 ICP18 同源类似物^[13-14],表明 ICP18 是蛙病毒特有的核心基因之一,推测其可能在蛙病毒属的生命周期中具有重要作用。之前对 ICP18 同源类似物的

报道主要集中在基因结构和启动子分析方面^[15]。目前, ICP18的功能还不是很清楚。

本研究主要着眼于 SG IV ORF086的原核表达、蛋白纯化及抗体制备。将构建好的重组质粒 pET32a-ORF086转化宿主 BL21(DE3)感受态细胞,进行表达。经 SDS-PAGE分析,重组菌比空载体菌在约 37.5 ku处多出一条含量很多的蛋白条带。进一步经 Western blot 鉴定,该条带能特异性地与 His·Tag 单克隆抗体发生反应,证实了 37.5 ku 带为含有目的蛋白的融合表达产物。由于 pET32a 载体上带有一段编码硫氧还蛋白的序列和 6 个组氨酸标签序列与插入的目的基因一起融合表达,因此表达产物的相对分子质量是三者之和,约 37.5 ku 比目的蛋白相对分子质量大 21.4 ku。重组表达产物经诱导表达条件优化,结果表明诱导温度对融合蛋白可溶性的影响较为明显。在 16℃ 下 0.7 mmol/L IPTG 诱导 14 h 可以得到大量的可溶性融合蛋白。经镍琼脂糖凝胶预成柱纯化融合蛋白,得到融合蛋白的纯度达 95% 以上。用纯化蛋白免疫小鼠制备的 SG IV ORF086 抗血清高效特异,既可用于 SG IV ORF086 功能研究,又可用于 SG IV 的早期检测。

参考文献:

- [1] Qin Q W, Lan T J, Sin Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* [J]. *Journal of Virological Methods* 2001, 98: 17-24.
- [2] Qin Q W, Chang S F, Ngho G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms* 2003, 53: 1-9.
- [3] Song W J, Qin Q W, Qiu J, et al. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis [J]. *Journal of Virology* 2004, 78: 12576-12590.
- [4] Song W, Lin Q, Joshi S B, et al. Proteomic Studies of the Singapore Grouper Iridovirus [J]. *Molecular and Cellular Proteomics* 2006, 5: 256-264.
- [5] Teng Y, Hou Z, Gong J, et al. Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus Singapore grouper iridovirus (SG IV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Virology* 2008, 377: 39-48.
- [6] Mao X L, Zhou S, Xu D, et al. Rapid and sensitive detection of Singapore grouper iridovirus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 105: 389-397.
- [7] Wang F, Bi X, Chen L M, et al. ORF018R, a highly abundant virion protein from Singapore grouper iridovirus is involved in serine/threonine phosphorylation and virion assembly [J]. *Journal of General Virology* 2008, 89: 1169-1178.
- [8] Huang X H, Huang Y H, Gong J, et al. Identification and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) homolog from Singapore grouper iridovirus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 373: 140-145.
- [9] Moss B, Shisler J L. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes [J]. *Seminars in Immunology* 2001, 13: 59-66.
- [10] Hobbs W E, DeLuca N A. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0 [J]. *Journal of Virology* 1999, 73: 8245-8255.
- [11] Kinchington P R, Fite K, Seman A, et al. Virion Association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase [J]. *Journal of Virology* 2001, 75: 9106-9113.
- [12] Willis D, Foglesong D, Granoff A. Nucleotide sequence of an immediate-early frog virus 3 gene [J]. *Journal of Virology* 1984, 53: 905-912.
- [13] Eaton H E, Metcalf J, Penny E, et al. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes [J]. *Virology Journal* 2007, 19: 4-11.
- [14] Huang Y, Huang X, Liu H, et al. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae [J]. *BMC Genomics* 2009, 10(224): 1-14.
- [15] Pallister J, Goldie S, Coupar B, et al. Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP18, ICP46 and major capsid protein genes [J]. *Archives of Virology* 2005, 150: 1911-1919.