

Display of Classical Swine Fever Virus E2 Protein BC Antigenic Domain on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae*

Xiaofeng Liu, Qian Wang, Mingyang Luo, Jinfu Sun*

Institute of Biotechnology, College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang Liaoning
Email: *sunjinfu@mail.neu.edu.cn

Received: Aug. 28th, 2017; accepted: Sep. 7th, 2017; published: Sep. 14th, 2017

Abstract

To construct the yeast display system of classical swine fever virus E2 glycoprotein BC antigenic domain, gene fragment was cloned by PCR using pVEXE2 as a template. E2BC was inserted into the site of *BamH* I and *EcoR* I of p1v5AG to produce recombinant surface displaying vector of p1E2BCAG. p1E2BCAG was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* by LiAC method. After recombinant cells were cultivated, indirect immunofluorescence was used to detect E2BC expression. The results indicate that E2BC protein was displayed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* cell successfully. This work provides a foundation for the development of *Saccharomyces cerevisiae* vector oral vaccine of CSFV E2BC protein.

Keywords

Yeast Surface Display, Classical Swine Fever Virus, E2BC Antigenic Domain, Oral Vaccine

猪瘟疫病毒E2蛋白BC抗原域的酿酒酵母表面展示

刘小凤, 汪 倩, 罗明阳, 孙金福*

东北大学生命科学与健康学院生物技术研究所, 辽宁 沈阳
Email: *sunjinfu@mail.neu.edu.cn

收稿日期: 2017年8月28日; 录用日期: 2017年9月7日; 发布日期: 2017年9月14日

摘 要

为构建猪瘟疫病毒(CSFV)E2蛋白的B、C抗原域(E2BC)酿酒酵母表面展示体系, 以pVEXE2为模板, 用PCR

*通讯作者。

克隆了E2BC基因, 并插入酵母展示表达载体p1v5AG的BamH I和EcoRI位点, 构建重组酵母展示表达载体, 用LiAC方法转化酿酒酵母细胞W303, 构建重组酵母菌。重组菌经培养后, 对酵母菌细胞进行针对His标签的间接免疫荧光染色, 检测His-E2BC融合表达蛋白。结果显示, 重组酵母菌表面有绿色荧光, 表明E2BC蛋白成功表达于酵母表面, 为开发酵母载体口服疫苗奠定了基础。

关键词

酵母表面展示, 猪瘟病毒, E2BC抗原域, 口服疫苗

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)是黄病毒科瘟病毒属有囊膜的单股正链 RNA 病毒[1]。病毒基因组编码一个约有 4000 个氨基酸的多聚蛋白, 此蛋白在翻译后可由细胞和病毒蛋白酶裂解生成 4 个结构蛋白(C、E^{ms}、E1 和 E2)和 8 个非结构蛋白(N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B) [2]。结构蛋白 E2 位于病毒的囊膜表面, 参与病毒的感染过程, 能诱导产生强有力的保护性免疫, 是 CSFV 的主要保护性抗原蛋白。E2 可分为 A、B、C、D 四个抗原域, 其中 B、C 区域为产生抗原决定簇的主要区域[3] [4]。

酵母细胞表面展示系统是一种固定化表达异源蛋白质的真核展示系统, 近几年来已被广泛应用于生物催化剂、细胞吸附剂、活疫苗、环境治理、蛋白质文库筛选、高亲和抗体、生物传感器、抗原/抗体库构建、癌症诊断等领域[5]。

本研究利用酿酒酵母表面展示系统(以细胞壁甘露糖蛋白 a 凝集素碳端 320 个氨基酸域为锚定蛋白)将 CSFV E2 蛋白 BC 抗原域展示在酵母细胞表面, 用间接免疫荧光方法检测了带有 His 蛋白标签的 BC 抗原域融合蛋白的表达, 为基于 E2 蛋白 BC 抗原域的酵母载体疫苗研制奠定了基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌株、载体

细胞株 *E. coli* DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司; 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) W303、表达载体 p1V5-AG [6]及酿酒酵母 w303 由东北大学杨婷博士提供; pcDNA3.1 表达载体、pVEXE2 重组质粒(含 E2 序列)由本实验室保存。

2.1.2. 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、DNA Marker DL2000、T4 DNA Ligase、10 \times T4 DNA Ligase Buffer、6 \times Loading Buffer 为 TaKaRa 公司产品; DNA Marker 5000, 2 \times Power Pfu MasterMix 购自北京 BioTeke 生物技术有限公司; 质粒 DNA 小量快速制备试剂盒、胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司; His-probe (AD 1.1.10) mouse monoclonal IgG 和 goat anti-mouse IgG-FITC 购自 Stanta Cruz Biotechnology。引物(Primer)合成和 PCR 产物测序由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成。

2.1.3. 培养基

Yeast Nitrogen Base W/O Amino acids, adenine, L-Tryptophan, L-Histidine, L-Leucine 为 BIOSHARP 公司产品; 胰蛋白胨、琼脂粉购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 酵母提取物购自 OXUID LTD。Luria-Bertani (LB)培养基含 1%氯化钠, 0.5%酵母提取物, 1%胰蛋白胨。YPDA 培养基含有 1%酵母提取物, 2%胰蛋白胨, 2%葡萄糖, 0.003% adenine。SD 培养基含 0.7%无氨基酸酵母氮源(Yeast Nitrogen Base, 2%), 葡萄糖, 0.003% L-his, 0.003% L-trp, 0.003% L-leu, 0.005% adenine, 固体平板添加 2%的琼脂。

2.2. 方法

2.2.1. E2 蛋白 BC 抗原域(E2BC)的基因克隆

根据 E2BC 基因的序列, 设计一对上、下游引物。为便于表达蛋白的检测, 在上游引物的 5'端加入 His 标签蛋白基因序列, 上下游引物序列为: U: 5'-CAAGGATCCCATCATCACCATCACCATCGCGTTATACCTCATATTGC-3', L:5'-AGCGAATTCACCCTGGTTAAATCCCTCA-3', 上、下游引物 5'端分别加入酶切位点 *Bam*H I、*Eco*RI (下划线标识, 斜体为 His 标签蛋白)。以 pVEXE2 重组质粒为模板, 利用 PCR 扩增 E2BC 基因片段, PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Eco* I 双酶切、凝胶回收后, 连接于 pcDNA3.1 载体的相应位点。

连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于 Amp 抗性 LB 固体平板, 培养过夜。挑取菌落进行菌落 PCR, 鉴定阳性转化子。取 PCR 鉴定阳性的菌落, 接种液体 LB 培养基, 提取质粒进行双酶切鉴定。双酶切鉴定正确的阳性转化子进行测序。

2.2.2. 酵母展示表达载体的构建

对测序正确的重组载体 pcDNA3.1-E2BC 进行 *Bam*H I 和 *Eco*RI 双酶切, 将获得的 E2BC 片段克隆至 p1v5AG 载体的相应位点, 替换载体的 v5 片段(图 1), 构建重组载体 p1-AG-E2BC, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 制备重组表达载体 p1-AG-E2BC。

2.2.3. 表达质粒转化至酿酒酵母

参照文献, 将重组载体 p1-AG-E2BC 转化酿酒酵母[7]。取酿酒酵母 W303 接种于 5 ml 液体培养基 YPAD, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 下振荡培养过夜。以 5×10^6 个/ml 的细胞密度接种至 50 ml YPAD 培养液。置 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养至细胞密度 2×10^7 个/ml, 用 50 ml 无菌离心管以 3000 g 离心 5 分钟, 收集细胞。重悬细胞于 25 ml 无菌水中, 再同上离心, 弃上清。用 1 ml 100 mmol 的乙酸锂(LiAc)溶液重悬酵母

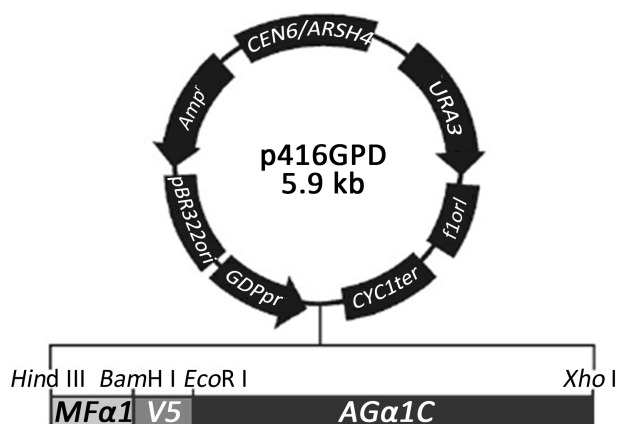


Figure 1. Map of p1v5-AG expression vector

图 1. 表达载体 p1v5-AG 图谱

细胞,并转移至一个无菌的 1.5 ml 离心管,高速离心 5 s 沉淀细胞,吸尽乙酸锂。用 500 μL 100 mmol 的乙酸锂(LiAc)溶液悬浮细胞(2×10^9 个/ml),将 1 ml ssDNA(单体)样品煮沸 5 min,快速在冰水中冷却。振荡细胞悬浮液,取 50 μL 酵母细胞加到标记的离心管中,离心沉淀细胞,除去乙酸锂。按下列顺序加入基本“转化混合液”:240 μL PEG (50% m/V),36 μL 1.0 mol/L 乙酸锂,25 μL ssDNA (2.0 mg/ml);50 μL 水和质粒 DNA (0.1 μg 到 10 μg)。振荡离心管直到细胞完全混匀。置 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min 后,置 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激 20 到 25 min。以 6000~8000 r/min 的速度离心 15 s,除去转化混合液。吸 0.2 ml 无菌 PBS 加到离心管中,悬浮菌体,取适量涂布接种于选择性平板培养基(SD)。

2.2.4. 重组酵母 E2BC 蛋白表达的检测

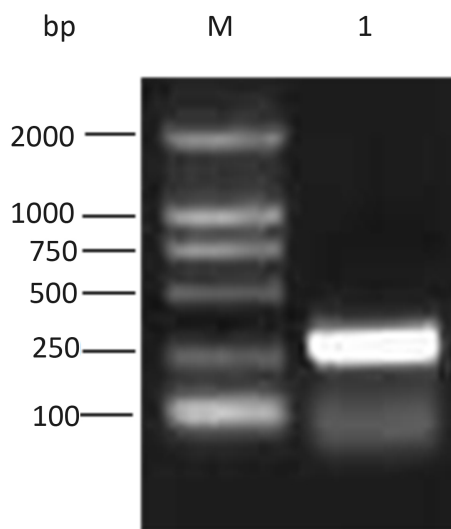
挑取在 SD 平板上的酵母转化子接种于 10 ml 的 SDC 培养基,培养 16 h。以此为种子液接种于 100 ml SDC 培养基,摇瓶培养 48 h。培养液 4500 rpm 离心 5 min 收集菌体,用 PBS 离心洗涤 3 次后,用 PBS 重悬菌体至 OD₆₀₀ = 6。取 200 μL 悬浮液离心,弃上清,再悬浮于 200 μL 含有 1%BSA 的 PBS 中。加入 1 μL (工作浓度 1:200)一抗(鼠抗 His 单抗),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,离心弃上清,用 PBS 洗涤 3 次,再悬浮于 200 μL 含 1%(W/V)BSA 的 PBS 中,加 1 μL (工作浓度 1:200)二抗(羊抗鼠 IgG-FITC),避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h。PBS 洗涤 3 次后悬浮沉淀,然后用荧光显微镜观察[8]。

3. 结果

3.1. E2BC 基因克隆

以 pVEXE2 重组质粒为模板,PCR 扩增 E2BC 目的基因片段,图 2 可见 250 bp 处有一明亮 DNA 条带,与 E2BC 基因预期大小 255 bp 相符,显示成功获得目的基因 E2BC。

将 E2BC 基因片段连接到真核表达载体 pcDNA3.1 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点,构建重组质粒载体 pcDNA3.1-E2BC。用 *Bam*H I 和 *Eco*RI 进行双酶切鉴定,得到了与 E2BC 大小相应的基因片段。用序列分析软件 DNAMAN5.2.2 将测得的序列与模板序列进行比对分析,显示插入的目的基因 E2BC 序列与模板序列一致,显示成功构建重组载体 pcDNA3.1-E2BC。



M. DL2000 DNA marker; 1. E2BC gene fragments

Figure 2. Amplification of E2BC gene with PCR

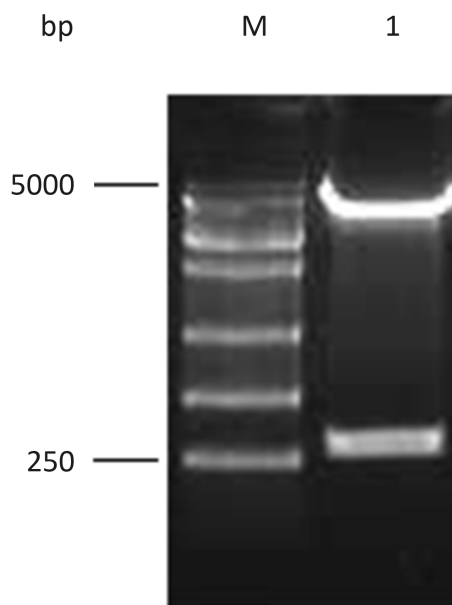
图 2. PCR 扩增 E2BC 基因

3.2. 酵母展示表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pcDNA3.1-E2BC 获得 E2BC 基因片段，将其纯化后插入 p1v5-AG 质粒载体的相应位点，替换载体 p1v5-AG 的 v5 片段(图 1)，经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定，获得与 E2BC 大小一致的基因片段，显示成功构建了重组载体 p1 E2BC-AG (图 3)。

3.3. 重组酵母菌 E2BC 蛋白表达

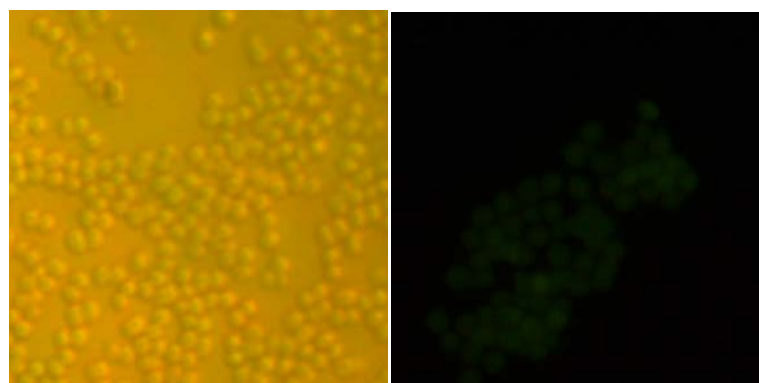
用间接免疫荧光染色法检测带有 His 标签的 E2BC 蛋白是否已经成功展示在酵母细胞表面。以鼠源抗 His 标签单克隆抗体为一抗，二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。间接免疫荧光染色后，用荧光显微镜观察，阴性对照酵母细胞没有观察到绿色荧光(图 4(a))，转化重组表达载体 p1-AG-E2BC 的酵母细胞观察到了绿色荧光(图 4(b))，表明 E2BC 蛋白成功表达在了酵母细胞表面。



M. DL5000 DNA marker; 1. Digestion of p1E2BC-AGs

Figure 3. Digestion of recombinant vector p1E2BC-AG with *Bam*HI and *Eco*RI

图 3. 重组载体 p1E2BC-AG 双酶切鉴定



(a) Normal yeast cells

(b) Recombinant yeast cells

Figure 4. Detection of E2BC expression by IFA

图 4. 间接免疫荧光染色检测 E2BC 蛋白的表达

4. 讨论

酵母展示系统可用来展示病原微生物的抗原, 制备疫苗。重组酵母载体疫苗具有生产成本低, 应用方便, 可口服免疫等优点。酵母细胞壁成分还具有天然的佐剂活性, 因此在酵母表面展示的抗原蛋白能够诱导良好的免疫[9]。

Wasilenko 等[10]将高致病禽流感病毒的血凝素蛋白展示于酵母细胞表面, 重组酵母菌口服免疫鸡, 诱导机体产生了中和抗体。Lei 等[11]将禽流感病毒 H5N1 血凝素展示到酵母菌表面, 口服免疫小鼠诱导产生了体液和细胞介导的免疫。加强免疫后, 可产生高水平的 HA 特异的 IgG1 和 IgG2a 抗体。攻毒实验显示, 口服疫苗组可全部抵抗致死性 H5N1 的攻击。Kim 等[12]将胸膜肺炎放线杆菌血清型 2 株的 ApxIIA 毒素表位片段展示于酿酒酵母细胞表面。每次用 5×10^7 个重组酵母口服免疫小鼠, 免疫四次后, 小鼠产生了针对胸膜肺炎放线杆菌的保护性特异抗体。免疫小鼠接种胸膜肺炎放线杆菌 72 小时后, 免疫保护率是 40%。Zhao 等[13]利用酵母细胞表面展示技术制备了口服传染性造血组织坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)疫苗 EBY100/pYD1-bi-G。虹鳟鱼口服该疫苗后, 可获得非特异和特异的免疫反应。口服免疫后, 在脾、后肠和前肾 IFN-1 和 Mx-1 表达水平显著提高, 诱导产生了高滴度的中和抗体, 攻毒保护率为 45.8%。

CSFV 的 E2 糖蛋白是最主要的免疫抗原, 能够独立诱导机体产生保护性抗体。E2 蛋白可分为 A、B、C、D 四个功能区, 其中 B、C 区域是主要的抗原决定簇区, 能够诱导产生保护性中和抗体。Dong 等[14]合成制备了 E2 蛋白 BC 抗原决定区的五个重叠多肽 P1-P5, 并分别与牛血清白蛋白(BSA)相偶联。用这些多肽混合铝佐剂免疫猪, 产生了强有力的免疫保护力。攻毒试验显示, 免疫组全部健康存活, 对照组的猪全部很快出现临床症状并死亡。

本研究将 CSFV 的 E2BC 基因插入酵母展示表达载体, 将 E2BC 与酵母细胞壁甘露糖蛋白 a 凝集素融合表达, 利用酿酒酵母细胞内蛋白转运到膜表面的机制(GPI 锚定)将 E2BC 蛋白锚定在酵母细胞表面。针对 His 标签蛋白的间接免疫荧光染色显示 E2BC 得到表达, 并锚定在酿酒酵母细胞的表面。这些工作为基于 E2 蛋白 B、C 抗原域的 CSFV 酵母载体口服疫苗的研制奠定了基础。

基金项目

国家自然科学基金重点项目(31130052)。

参考文献 (References)

- [1] Simmonds, P., Becher, P., Collett, M.S., et al. (2011) Family Flaviridae. In: King, A.M.Q., Lefkowitz, E. and Adams, M.J., Eds., *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*, Academic Press, San Diego, 1002-1020.
- [2] Lindenbach, B.D., Thiel, H.J. and Rice, C.M. (2007) *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- [3] Van Rijn, P.A., Van Gennip, H.G., de Meijer, E.J. and Moormann, R.J.M. (1993) Epitope Mapping of Envelope Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus Strain Brescia. *Journal of General Virology*, **74**, 2053-2060. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-10-2053>
- [4] Van Rijn, P.A., Miedema, G.K., Wensvoort, G. and Moormann, R.J.M. (1994) Antigenic Structure of Envelope Glycoprotein E1 of Hog Cholera Virus. *Journal of Virology*, **68**, 3934-3942.
- [5] 郭钦, 张伟, 阮晖, 等. 酿酒酵母表面展示表达系统及应用[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 116-122.
- [6] Vinopal, S., Ruml, T. and Kotrba, P. (2007) Biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by Cell Surface-Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60**, 96-102.
- [7] Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast*, **11**, 355-360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- [8] 向柱方, 林影, 叶波, 等. HIV-1 gp41 的酵母表面展示及表达优化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 684-689.

- [9] Stubbs, A.C., Martin, K.S., Coeshott, C., *et al.* (2001) Whole Recombinant Yeast Vaccine Activates Dendritic Cells and Elicits Protective Cell-Mediated Immunity. *Nature Medicine*, **7**, 625-629. <https://doi.org/10.1038/87974>
- [10] Wasilenko, J.L., Sarmiento, L., Spatz, S. and Pantin-Jackwood, M. (2010) Cell Surface Display of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin on the Surface of *Pichia pastoris* Cells Using Alpha-Agglutinin for Production of Oral Vaccines. *Biotechnology Progress*, **26**, 542-547.
- [11] Lei, H., Jin, S., Karlsson, E., *et al.* (2016) Yeast Surface-Displayed H5N1 Avian Influenza Vaccines. *Journal of Immunology Research*, **2016**, 4131324.
- [12] Kim, J.M., Jung, D.I., Eom, Y.J., Park, S.M., Yoo, H.S., Jang, Y.S., Yang, M.S. and Kim, D.H. (2010) Surface-Displayed Expression of a Neutralizing Epitope of ApxIIA Exotoxin in *Saccharomyces cerevisiae* and Oral Administration of It for Protective Immune Responses against Challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 1362-1367. <https://doi.org/10.1271/bbb.90941>
- [13] Zhao, J.Z., Xu, L.M., Liu, M., *et al.* (2017) Preliminary Study of an Oral Vaccine against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Using Improved Yeast Surface Display Technology. *Molecular Immunology*, **85**, 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.001>
- [14] Dong, X.N., Chen, Y., Wu, Y. and Chen, Y.H. (2005) Candidate Multi-Peptide-Vaccine against Classical Swine Fever Virus Induced Potent Immunity with Serological Marker. *Vaccine*, **23**, 3630-3633. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.02.008>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: amb@hanspub.org