

# 对虾白斑综合征病毒 VP28 酵母表面展示

李新新 刘庆慧\* 张秀丽 黄 健

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 以 pYD1 为载体, 制备以酒精酵母为载体的基因工程免疫制剂。参照 GenBank 中对虾白斑综合征病毒 VP28 基因序列设计引物, PCR 扩增得到预期长度的产物, 双酶切插入用于酒精酵母表面展示的穿梭质粒载体 pYD1, 转化大肠杆菌 TOP10, 提取阳性质粒转化酒精酵母菌株 EBY100, 诱导表达后, 用免疫荧光检测外源蛋白的表达。结果获得 VP28 酵母表面展示菌, 测得最佳诱导时间为 36~48 h。以此展示酵母活细胞分设两个浓度组, 腹腔注射螯虾, 检测其毒性。结果表明, 此重组酵母对螯虾是安全的, 该研究为下一步对虾用活载体免疫制剂效果的研究奠定了基础。

**关键词** 对虾白斑综合征病毒 VP28 酵母表面展示 安全性

**中图分类号** S945.46 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)01-0061-05

## Yeast surface display of white spot syndrome virus VP28

LI Xin-xin LIU Qing-hui\* ZHANG Xiu-li HUANG Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** pYD1 was selected to make a vaccine using *Saccharomyces cerevisiae* pair as the live carrier. One pair of primers was designed according to the gene encoding white spot syndrome virus (WSSV) of VP28. VP28 gene was obtained by using PCR method. Fragment of VP28 was ligated into pYD1 and then transformed with *E. coli* TOP10. The construct was propagated in *E. coli* TOP10 and then was transformed into the yeast strain EBY100. The display of VP28 protein on the yeast surface was confirmed by fluorescent staining with antibody analysis. The results showed that VP28 was displayed on yeast surface. The infection test indicated that the yeast cells displaying VP28 was safe to *Procambarus clarkii*. This work is helpful for further research on the immunological effect of the live vaccine.

**KEY WORDS** WSSV VP28 Yeast surface display Safety

对虾白斑综合征病毒曾在世界大范围内引发海水养殖虾类的暴发病, 给对虾产业造成巨大损失。近年的研究表明, 对虾存在类免疫(Quasi-immune)机制, WSSV 的重组蛋白可以诱导对虾产生抗病保护效应。目前有关对虾白斑综合征病毒亚单位疫苗的研究大多围绕诱导产生高效免疫应答能力的囊膜蛋白进行免疫接种方式来展开(Witteveldt *et al.*, 2004; Jha *et al.*, 2006; Vaseeharan *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2008; Li *et al.*,

对虾行业专项(200803012)和国家自然科学基金(30871942)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-02-19; 接受日期: 2011-10-30

作者简介: 李新新(1987-), 男, 主要从事生物技术方面的研究。E-mail: xx503203137@163.com, Tel: 13695324367

2009)。酵母表面展示是近年发展的一种新的蛋白表面展示技术,通过表面展示技术使之暴露在酵母细胞表面的多肽抗原更容易被免疫系统识别,同时酵母细胞表面成分可以起到免疫佐剂的作用。酒精酵母菌为食品级微生物,具备安全、容易培养的优点,可以很容易地过渡到廉价的口服疫苗,通过简单而又安全的方式接种(池振明等 2007)。

基于酵母细胞表面展示技术的基因工程活载体抗病制剂,在对虾类防病的研究中至今未见报道。本研究拟在酒精酵母细胞表面表达对虾白斑综合征病毒结构蛋白 VP28,以便为制备以对虾白斑综合征病毒结构蛋白为靶抗原的活载体抗病制剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

美国 Invitrogen 公司质粒载体 pYD1 及其受体菌 EBY100。大肠杆菌 TOP10。

#### 1.1.2 分子生物学酶及试剂

*Hind* III 和 *Xho* I 两种限制性内切酶, *Taq* DNA 聚合酶, *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶购自大连宝生物公司, anti-VP28 为本实验室制备,羊抗鼠-FITC 二抗购自北京博奥森公司。其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 主要培养基

YPD 培养基(1%酵母提取物,2%胰蛋白胨,2%葡萄糖)、YNB(Trp,Leu)固体培养基(0.67% YNB,2%葡萄糖,0.01%亮氨酸,0.01%色氨酸,1%琼脂)和 YNB-CAA 培养基(0.67% YNB,0.5% Casamino acids)均按 Invitrogen 试剂盒说明配制。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 VP28 基因片段的扩增与重组质粒的构建

参考 GenBank VP28 基因序列(wsv421)与 pYD1 多克隆位点序列,设计 1 对引物扩增 WSSV-VP28 基因,在引物两端分别引入 *Eco*RI 和 *Xho*I 限制性内切酶位点,正向引物(P1)为:GGCGGAATTCATG-GATCTTTCTTTCACT,反向引物(P2)为:TTCCTCGAGCTCGGTCTCAGTGCC(下划线分别为 *Eco*RI 和 *Xho*I 限制性内切酶序列),引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

以 WSSV 中提取的 DNA 为模板,用合成的引物进行 PCR 扩增反应,反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 40 s,50℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 10 个循环;再 94℃ 变性 40 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 反应产物 3 μl 加入 1 μl 上样缓冲液>Loading buffer)和 GeneFinder 的混合液(1:9)在含有 GeneFinder 的 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳检测。切胶回收目的产物,双酶切回收的 PCR 产物与双酶切的 pYD1 连接,转化感受态大肠杆菌 TOP10。

#### 1.2.2 阳性克隆的鉴定

随机挑取 12 个单克隆分别为 1~12 号进行扩大培养,并以菌液为模板,以 VP28 引物进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

对 PCR 阳性扩大培养的单克隆菌液提取质粒并进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测,将上述 PCR 产物切胶回收送到大连宝生物工程有限公司进行测序,测序正确的克隆命名为 pYD1-VP28。

#### 1.2.3 EBY100 感受态细胞的制备

取实验室保藏的 EBY100 于 YNB(Trp,Leu)平板上划线培养,从 YNB(Trp,Leu)平板上,挑取单个酵母菌落,接种于 5 ml YPD 培养液中,30℃ 振荡培养 14 h,将菌液转移至含有 50 ml YPD 培养液的锥形瓶中(调整菌液浓度,使其 OD<sub>600</sub> 值为 0.4),继续振荡培养 3~5 h。取菌液于 4℃、2 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 40 ml TE 缓冲液洗涤细胞后,置于离心管中,加入 2 ml TE 缓冲液稀释的醋酸锂溶液(1 mmol/L LiOAc/1× TE),室温作用 10 min,获得感受态细胞。

### 1.2.4 重组质粒(VP28-pYD1)对酵母感受态细胞的转化

取 100  $\mu\text{l}$  感受态细胞( $1 \times 10^8$  细胞/ml)与 5  $\mu\text{l}$  pYD1-VP28 重组质粒( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 在 EP 管中混匀后,加入 700  $\mu\text{l}$  醋酸锂转化溶液(1 mmol/L LiOAc/40% PEG3350/1 $\times$  TE),振荡 10 s,30  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min;再加入 88  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜,42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 7 min 后,14 000 r/min 离心 5 s,弃上清液,用 0.5 ml TE 缓冲液重悬细胞。取 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液涂布于缺乏色氨酸的 YNB(Leu) 营养缺陷型平板上,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 2~4 d,获得转化成功的酵母菌落。同法,用空载体 pYD1 转化感受态细胞作为不表达目的基因产物的阴性对照。

### 1.2.5 VP28-pYD1 蛋白的诱导表达

于上述营养缺陷型平板上挑取阳性单个酵母菌落,接种于 5 ml 含有 2% 葡萄糖的 YNB-CAA 培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养过夜;当菌液 OD<sub>600</sub> 值在 2.0~5.0 时,3 000~5 000 r/min 离心 5~10 min,弃上清液,再用含有 2% 半乳糖的 YNB-CAA 培养基重悬细胞(使其 OD<sub>600</sub> 值为 0.5~1.0),20  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养诱导目的蛋白表达;在诱导表达的 0、12、24、42 h 分别取出 1 ml 细胞培养物作为待鉴定的细胞样品,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2.6 展示 VP28 蛋白的酵母细胞的鉴定

分别在诱导表达后 0、12、24、42 h 测 OD<sub>600 nm</sub> 值,冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  存放,以 EBY100 为阴性对照,以 EBY100/PYD1-VP28 菌株为阳性对照做免疫荧光检测,一抗为 anti-VP28,二抗为羊抗鼠-FITC,分别按照要求的稀释倍数用含 1.0% BSA 的 PBS 稀释后置冰上待用,各样品用 PBS 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 g 离心洗涤后,加入一抗 anti-VP28,冰上放置 30 min,PBS 洗涤后,加入二抗,避光冰上放置 30 min,PBS 离心洗涤后加入 PBS 40  $\mu\text{l}$ ,取少量在荧光显微镜下检测并拍照。

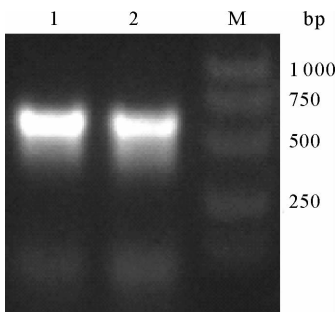
### 1.2.7 螯虾毒性试验

收集诱导培养后的 EBY100-VP28 细胞,测 OD<sub>600 nm</sub> 值,经 PBS 洗涤重悬于 PBS 中,分别用  $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$  cells/ml 两个浓度组腹腔注射试验螯虾 0.1 ml/尾,每组 15 尾,正常饲养,观察 7 d,计算死亡螯虾尾数。

## 2 结果

### 2.1 VP28 基因扩增与质粒构建

以 WSSV DNA 为模板,P1/P2 为引物,其 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上呈现一条约 632bp 的条带,与预期结果相符。VP28 PCR 产物结果见图 1,割下约 632 bp 片段进行回收,用于构建 pYD1-VP28。pYD1 质粒提取结果见图 2,由图 2 中可见,提取 pYD1 质粒大小约 5 000bp,与预测相符。

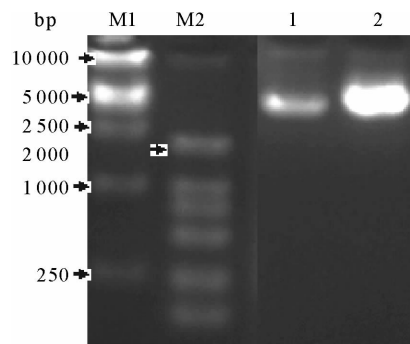


1 和 2 为扩增的 VP28, M: DNA Marker

Lane 1 and 2: VP28; Lane M: DNA Marker

图 1 PCR 扩增 VP28

Fig. 1 Amplification of VP28 by PCR



M1: DNA Marker (DL15000); M2: DNA Marker

(DL2000); 泳道 1 和 2: 纯化的 pYD1 质粒

Lane M1 and Lane M2: DNA Marker; Lane 1 and 2: Purified pYD1

图 2 纯化的 pYD1 质粒

Fig. 2 Purification of plasmid pYD1

### 2.2 pYD1-VP28 重组质粒转化的阳性菌落鉴定

VP28 基因的 PCR 扩增纯化片段经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,与经酶切的酵母展示载体 pYD1 进行连接,

转化大肠杆菌 TOP10,从含有氨苄青霉素的 LB 平板上挑取 4 个菌落,以 P1/P2 为引物进行菌落 PCR 鉴定,结果有 3 个菌株均出现 1 条与预期结果相符的约 600 bp 的条带,表明上述菌株为重组质粒转化成功的阳性克隆菌,将其命名为 pYD1-VP28。

### 2.3 重组质粒测序结果

以 pYD1-VP28 阳性菌株质粒 DNA 为模板,用 pYD1 载体为测序引物,对目的基因进行扩增并 DNA 全自动测序。结果显示,该菌株携带的目的基因片段的 DNA 序列与 GenBank 中 VP28 基因序列相符。

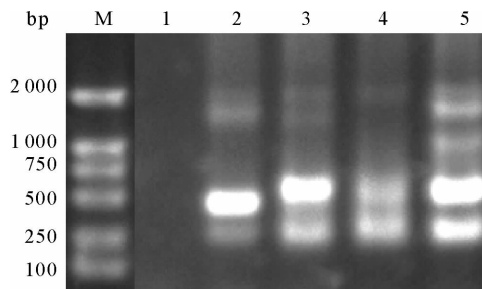
### 2.4 酵母细胞转化、目的转化子筛选

提取 pYD1-VP28 重组质粒涂布于缺乏色氨酸的 YNB(Leu)营养缺陷型平板上,30℃ 培养 2~4 d,获得转化成功的酵母菌落。同法,用空载体 pYD1 转化感受态细胞作为不表达目的基因产物的阴性对照。

### 2.5 pYD1-VP28 诱导表达及细胞免疫荧光检测

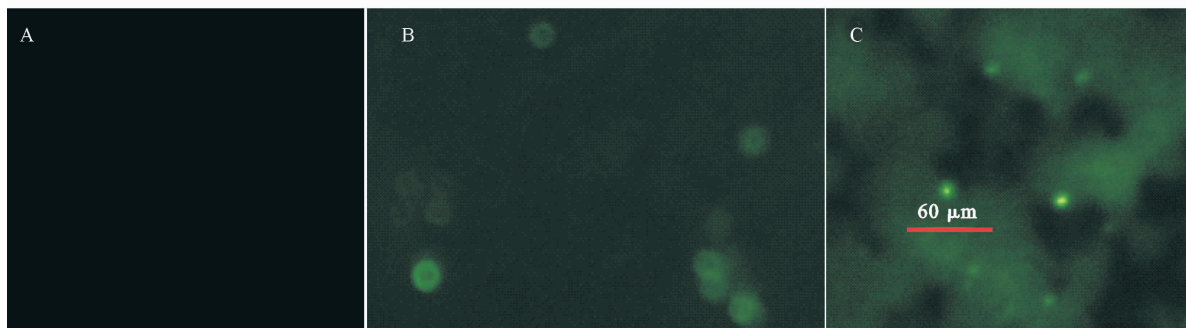
从缺乏色氨酸的 YNB 营养缺陷型平板上,挑取转化成功的酵母菌落,增菌培养、半乳糖诱导目的蛋白表达后,采用间接免疫荧光技术和流式细胞技术对诱导表达各时间点细胞样品进行检测鉴定。

荧光显微镜检测发现,pYD1-VP28 重组质粒转化组除 0 h 外,其他各时间点(24、42 h)细胞样品均可见酵母细胞荧光着染;而 pYD1 空载体转化组各时间点均未见酵母细胞荧光着染。图 4 显示诱导表达后 24、42 h pYD1-VP28 重组质粒转化组和 pYD1 空载体转化组细胞样品中酵母细胞荧光着染情况。上述所见表明目的蛋白 VP28 在 pYD1 重组质粒转化成功的酵母细胞表面得到展示。



M:DNA Marker; 1:阴性对照;2、3、4、5:重组质粒转化酵母  
Lane M:DNA Marker; Lane 1:negative control;  
Lane 2,3,4,5: recombinants

图3 pYD1-VP28 重组质粒转化酵母菌落 PCR 鉴定  
Fig.3 Confirmation of the recombinant pYD1-VP28 by PCR



A: 含 pYD1 空载体转化菌株; B: 含 pYD1-VP28 重组质粒的菌株经诱导表达 42h; C: 含 pYD1-VP28 重组质粒的菌株诱导表达 24h  
A: Control vector pYD1; B: Display of VP28 after incubation for 42h; C: Display of VP28 after incubation for 24 h

图4 免疫荧光检测展示的 VP28

Fig.4 Fluorescence detection of the displayed VP28

### 2.6 螯虾毒性试验

分别注射重组酵母菌高、低两个浓度( $10^6$ 、 $10^5$  cells/ml),注射剂量每尾 100  $\mu$ l,两个浓度组的螯虾都没有发生死亡现象,说明表面展示有 VP28 蛋白的活酵母对实验虾无毒。

## 3 讨论

微生物细胞表面工程是近年来发展起来的,它利用细胞表面展示技术使外源蛋白固定化于细胞表面,从而

生产微生物细胞表面蛋白(石 晶等 2004)。目前主要有革兰氏阴性细菌表面展示系统、革兰氏阳性细菌表面展示系统(向柱方等 2007)和酵母菌表面展示系统。酵母展示系统除作为展示载体,还可作为高蛋白单细胞食品级微生物,酿酒酵母细胞为 FDA 认证的安全营养酵母,而且酿酒酵母作为微生物可

以大规模培养。另外酵母细胞展示的蛋白不需经过蛋白质纯化即可获得高活性的蛋白,因而可通过在酵母表面表达异质性的抗原蛋白来发展疫苗(Yue *et al.* 2008)。

囊膜蛋白 VP28 在 WSSV 感染中起重要作用(Yi *et al.* 2004; 陈文博等 2009),本研究克隆了 WSSV-VP28 基因,构建重组 pYD1-VP28 并转入酵母细胞中,经诱导表达后,VP28 展示在酒精酵母细胞的表面。免疫荧光染色检测结果显示,重组酵母菌株诱导培养 24h 后,检测到外源蛋白的表达,直至诱导 42 h 均可检测到 VP28 荧光。荧光显微镜下观察到荧光强度在酵母细胞的表面分布即外源蛋白表达的分布是不均匀的(图 4)。

诱导表达后的活的重组酵母 EBY100/pYD1-VP28 全细胞对螯虾毒性实验结果显示,以很高的浓度  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/ml 注射,无死亡发生,表明它对螯虾是安全的,可进一步直接以活酵母形式添加在对虾饲料中作为口服免疫制剂使用,此外酵母细胞表面成分还可以起到免疫佐剂的作用。

表 1 重组酵母菌对螯虾的安全性实验结果

Table 1 Safety experiment of recombinant pYD1-VP28 on crayfish

各实验组浓度(cells/ml)	注射剂量( $\mu$ l)	螯虾(只)	死亡率
Concentration of each group	Dose of injection	Number of crayfish	Mortality(%)
重组酵母 $5 \times 10^5$	100	15	0
重组酵母 $5 \times 10^6$	100	15	0
酵母 EBY100 $5 \times 10^5$	100	15	0

## 参 考 文 献

- 石 晶,殷涌光,张桂林,于建群. 2004. 微生物细胞表面工程研究进展. 微生物学通报, 31(5):106~110
- 向柱方,林 影,王小宁,赵树进,韩双艳. 2007. 金黄色葡萄球菌功能蛋白的酵母表面展示. 华南理工大学学报, 35(11):105~109
- 朱开玲,池振明,梁丽琨,吴龙飞. 2007. 海洋哈维氏弧菌溶血素蛋白在酵母菌细胞表面上的展示及其活性的测定. 高技术通讯, 17(1):73~77
- 池振明,高玲美,岳礼溪,朱开玲,李 静. 2007. 利用酒精酵母细胞表面展示技术制备活疫苗及其潜在应用. 中国海洋大学学报, 37(6):947~950
- 陈文博,谭珍一,刘庆慧,侯 林,黄 捷. 2009. 对虾白斑综合征病毒 vp28 基因的表达及其与血细胞的结合. 渔业科学进展, 30(4):46~49
- Fu, L. L., Li, W. F., Du, H. H., Dai, W., and Xu, Z. R. 2008. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. Lett. Appl. Microbiol. 46(5):581~586
- Jha, R. K., Xu, Z. R., Bai, S. J., Sun, J. Y., Li, W. F., and Shen, J. 2006. Protection of *Procambarus clarkia* against white spot syndrome virus using vaccine expressed in *Pichia pastoris*. Fish Shellfish Immunol. 22(4):295~307
- Li, X., Liu, Q., Hou, L., and Huang, J. 2010. Effect of VP28 DNA on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International, 18(6):1 035~1 044
- Vaseeharan, B., Prem Anand, T., Murugan, T., and Chen, J. C. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. Lett. Appl. Microbiol. 43(2), 137~142
- Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M., and van Hulten, M. C. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. J. Virol. 78(4):2 057~2 061
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J., and Hu, L. 2004. VP28 of white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. J. Biochem. Mol. Biol. 37(6):726~734
- Yue, L., Chi, Z., Wang, L., Liu, J., Madzak, C., Li, J., and Wang, X. 2008. Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. Journal of Microbiological Methods, 72(2):116~123