

研究简报

HIV-1 gp41 的酵母表面展示及表达优化

向柱方¹, 林影¹, 叶波¹, 韩双艳¹, 赵树进²

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

2 广州军区广州总医院, 广州 510010

摘要: 以 His 标签检测蛋白的表达, 利用酿酒酵母表面展示系统, 成功地将 HIV-1 gp41 片段锚定在酵母表面, 并检测到 gp41 的活性。以 pMD18T-gp41 为模板, 通过 PCR 技术克隆了 gp41 基因, 将 gp41 基因通过双酶切连接到载体 pICAS-His 上, 构建了 gp41 酵母表面展示载体, 并将其转化至酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)MT8-1 中。重组菌经培养, 利用免疫荧光染色方法进行染色, 显微镜观察发现重组酵母细胞表面有绿色荧光, 流式细胞仪结果进一步证实 gp41 正确折叠展示于酵母细胞表面。采用不同浓度的葡萄糖培养基进行表达优化。当葡萄糖浓度为 1% 时, 82.46% 的酵母细胞表达了 gp41 抗原; 随着葡萄糖浓度升高, 蛋白表达受到抑制。

关键词: 酵母展示技术, HIV-1 gp41, 免疫荧光染色, 流式细胞仪

Yeast Surface Display of HIV-1 gp41 and Expression Enhancement

Zhufang Xiang¹, Ying Lin¹, Bo Ye¹, Shuangyan Han¹, and Shujin Zhao²

1 School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

2 Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area, Guangzhou 510010, China

Abstract: HIV-1 gp41 has been successfully anchored on the cell surface of yeast *Saccharomyces cerevisiae* by yeast cell-surface display systems using His-tag for the detection of protein expression. Gp41 activity has been detected by gp41 monoclonal antibody. The vector for gp41 yeast display has been constructed as follows: the gene-encoding gp41 was amplified by PCR using pMD18T-gp41 as a template, and then inserted into shuttle vector pICAS-His by restriction enzyme digestion. Next, the vectors were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1. After cultivation, recombinant cells were immunofluorescence labelled. The bright green cells were observed by the microscopy indicating the proteins have been displayed on the cell surface successfully, flow cytometry convinced that gp41 has been folded correctly on the cell surface. Then different concentrations of initial glucose were used to enhance the expression of protein. gp41 has been expressed by 82.46% yeast cells as the concentration of glucose was 1%. Protein expression was depressed when the concentration was increased.

Keywords: yeast display, HIV-1 gp41, immunofluorescence labeling, flow cytometry

人类免疫缺陷病毒 HIV (Human immunodeficiency virus) 借助病毒表面的外膜糖蛋白与宿主细胞融合, 是病毒侵入细胞的第一步。外膜糖蛋白前体 gp160 在蛋白水解酶的作用下被分解

Received: August 14, 2007; **Accepted:** September 29, 2007

Supported by: Guangdong Provincial Commission of Science and Technology (No. G02B2041120).

Corresponding author: Ying Lin. Tel: +86-20-39850818; E-mail: feylin@scut.edu.cn

广东省科技计划项目(No. G02B2041120)资助。

为 2 个亚基 gp120 和 gp41^[1]。gp41 由 4 个功能区域组成: N 端融合肽、外膜区域、跨膜区以及细胞质区^[2]。抗原 gp41 被作为 HIV 感染的标志, 广泛应用于 HIV 特异性抗体的检测中^[3,4]。常规的 ELISA 方法需要高纯度的抗原, 抗原制备步骤较繁琐, 特别是一些病毒肿瘤的特异性抗原制备较困难, 而且不能正确折叠。因此, 基于癌症细胞的 ELISA 已经成功应用于定量^[5,6]。

近年来, 酵母表面展示体系广泛应用于生物催化^[7,8], 抗原的展示^[9], 酶的定向进化^[10]等方面。酵母细胞容易培养, 展示于酵母细胞表面的抗原, 不用分离纯化即直接可应用。本实验利用酿酒酵母表面展示系统(细胞壁甘露糖蛋白-凝集素作为锚定蛋白)首次成功地将 HIV gp41 外膜区域展示在酵母细胞表面, 以 His 作为标签检测其蛋白的表达, 并进行了表达优化实验。展示有 gp41 的酵母重组菌有希望进一步应用于活细胞 ELISA, 为基于酵母细胞的 ELISA 提供了可能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体

菌株 *Escherichia coli* Top10F⁺ 购自 Invitrogen 公司; 穿梭质粒 pICAS, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MT8-1^[11] 由日本京都大学植田充美教授惠赠; pMD18T-gp41 为广州万孚生物技术有限公司构建。

1.1.2 分子生物学试剂

限制性内切酶 *Kpn*、*Bgl*、*Sac*、*Xho*、*Xba*, Ex Taq 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DL2000 DNA Maker 为 TaKaRa 公司产品, 1 kb DNA Maker 购自鼎国生物技术有限公司。Qiagen PCR 产物纯化试剂盒, 胶回收试剂盒, DNAeasy 基因组提取试剂盒均购自基因有限公司, Yeast Maker 酵母转化试剂盒购自 Clontech 公司。牛血清白蛋白组分 (BSA) 购自广州威佳生物技术有限公司, 用于荧光检测的一抗如下: 鼠源 His 单克隆抗体为 Novagen 产品, 鼠源 gp41 单克隆抗体为 Biodesign 公司产品; 二抗为羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的 IgG 为 Molecular Probes 生产。DNA 的合成与测序均由上海生工生物工程有限公司完成。

1.1.3 培养基

无氨基酸酵母氮源 (Yeast nitrogen base), 蛋白胨均购自 Difco; 酵母抽提物购自 Oxford 公司; 酸水解干酪素购自威佳科技公司; 氨基酸、核苷酸购于广州博理生物技术有限公司。其中: Luria-Bertani (LB): 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母抽提物, 1% 氯化钠。YPD: 2% 蛋白胨, 1% 酵母抽提物, 2% 葡萄糖。SDC: 0.67% YNB, 1%~4% 不同浓度梯度的葡萄糖, 2% 酸水解干酪素, 微量的氨基酸、核苷酸。固体平板添加 2% 的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 pICAS 表达载体的改造

为了便于检测, 对 pICAS 载体进行了改造, 加上了 His 标签, 并分别命名为 pICAS-His。所应用的引物分别为:

Hf: 5'-TTACTCGAGATCATCATCATCATCATCATCAGCCAAAAGCTCTTTTATC-3';

Hr: 5'-CCGGGTACCTTTGATTATGTTCTTTCTATTG-3', 酶切位点为 *Xho* I 和 *Kpn* I, 用以添加 His 标签; 以 pICAS 为模板, 用以上引物扩增 His 标签, 经 PCR 纯化试剂盒纯化, 通过 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切, 同样酶切 pICAS 载体, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收, 以 T4 DNA 连接酶 16°C 连接过夜, 构建载体 pICAS-His, 转化 *E. coli* TOP10 感受态, 提取质粒 DNA, 双酶切鉴定、测序。

1.2.2 gp41 表达载体的构建

以 pMD18T-gp41 为模板, 所用的引物为 5'-CAGATCTCAATGACGCTGACGGTACA-3' 和 5'-TCGCTCGAGACCAATTTGTTATGTTAAACC-3', 酶切位点(下划线标识)为 *Bgl* II 和 *Xho* I。利用 PCR 扩增 gp41 片段, 经 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切, pICAS-His 也同样经过双酶切, 如 1.2.1 的步骤, 构建载体 pICAS-His-gp41。转化大肠杆菌, 提取质粒, 双酶切鉴定后, 送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 表达质粒转化至酿酒酵母

用 *Xba* I 酶切载体 pICAS-His, pICAS-His-gp41, 使其线性化后, 用醋酸锂法转化, 按照试剂盒步骤, 将基因整合至酵母基因组, 重组酵母为 MT8-1/pICAS-His, MT8-1/pICAS-His-gp41。pICAS 作为阴性对照, 重组酵母为 MT8-1/pICAS。将转化子铺到 SDC 板上, 30°C 培养箱培养 48 h。

1.2.4 蛋白的表达以及免疫荧光检测

将重组酵母转化子接种于 10 mL SDC 液体培养基中,同时接种重组酵母 MT8-1/pICAS 作为阴性对照, 30°C 培养 16 h 后,作为种子液接种于 100 mL SDC 培养基中,在葡萄糖存在的条件下诱导蛋白的表达。4500 r/min, 5 min 收集菌体,用 PBS 洗涤菌体,调整 OD_{600} 为 10。200 μ L 酵母细胞离心取沉淀,后悬浮于 200 μ L 含有 1%(W/V) BSA 的 PBS 中,免疫染色的一抗按相应比例稀释,孵育 2 h。PBS 洗涤细胞后,用 200 μ L 含 1% BSA 的 PBS 悬浮细胞,加入 1 μ L (按 1:200 稀释)羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的 IgG,室温孵育 1 h。用 PBS 洗涤两次。在 Olympus DP70 荧光显微镜下观察,上流式细胞仪(Beckman Coulter)进行检测。

1.2.5 gp41 表达优化

采用不同的葡萄糖浓度(1%、2%、3%、4%)的 SDC 培养基诱导蛋白的表达。先将转化子先 30°C 培养 16 h 后,将其分别接种于不同葡萄糖浓度的 SDC 培养基中。每隔 12 h 后取样检测 gp41 蛋白的表达情况。方法如 1.2.4。

2 结果

2.1 pICAS-His 表达载体的构建

为了便于检测,在酵母展示载体 pICAS 的多克隆位点和 α -凝集素之间插入 His 标签。PCR 产物经 1%凝胶电泳,结果如图 1 所示。

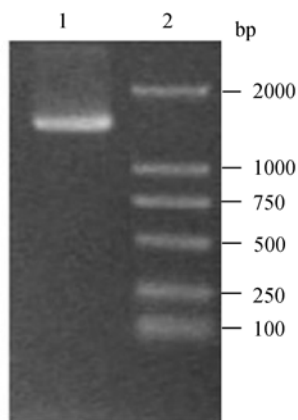


图1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products
1: fragment with His tag; 2: DL2000 DNA marker.

从图 1 可见,在 1500 bp 附近有一条明显的带。扩增产物中包括凝集素片段片段大小为 1400 bp。将

改造后的载体 pICAS-His 经 *Xho* I-*Kpn* I 双酶切, *Xho* I 单酶切,经 1%凝胶琼脂糖电泳,结果如图 2 所示。

由电泳图 2,可以清楚的看见双酶切产物,较小的条带与图 1 中的 PCR 产物大小一致,另外条带大小位于 5000 bp 附近,与原载体 Picas (6454 bp)去掉凝集素基因片段以后的大小一致。由此可见载体 pICAS-His 已经成功构建。

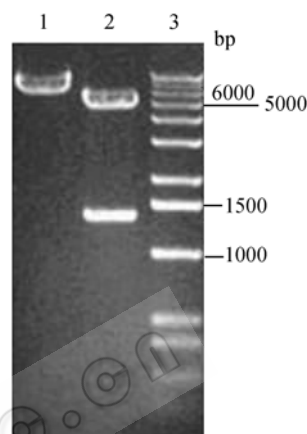


图2 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切 pICAS-His 鉴定图

Fig. 2 Restriction map of pICAS-His digested with *Xho* I and *Kpn* I

1: pICAS-His digested with *Xho* I; 2: pICAS-His digested with *Xho* I and *Kpn* I; 3: 1kb DNA Marker

2.2 gp41 表达载体 pICAS-His-gp41 的构建

表达载体质粒图见图 3 所示。以 pMD18T-gp41 为模板,扩增 gp41 基因,电泳结果见图 4。将 gp41 基因插入载体 pICAS-His 中,提取质粒。重组载体 pICAS-His-gp41 经过限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切后,在 450 bp 附近出现一条明显的带(图未标示)。初步可以认为 gp41 基因已经克隆到 pICAS-His 中。测序结果表明插入表达质粒的目的

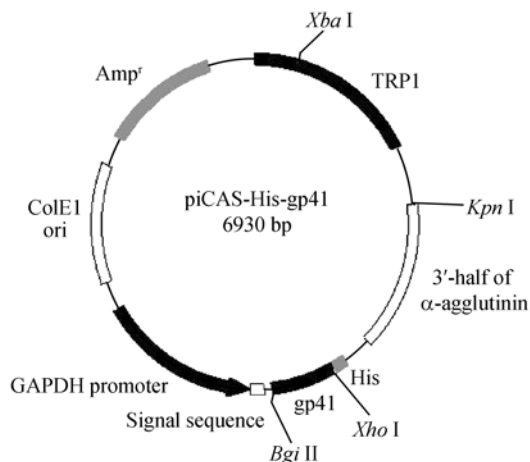


图3 表达载体pICAS-His-gp41质粒图

Fig. 3 Expression plasmid of pICAS-His-gp41

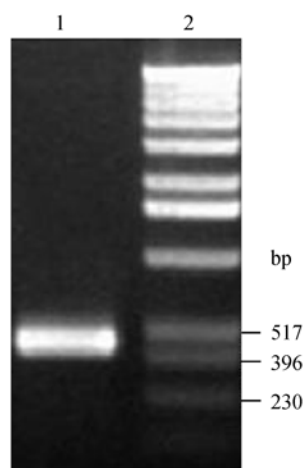


图 4 PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products

1: gp41 fragment ; 2: 1 kb DNA marker

基因序列与设计一致,与 GeneBank 中的序列比对,核苷酸序列一致性达到 99%,蛋白质翻译密码无误。表达载体中的分泌信号肽将展示蛋白分泌至胞外,通过 α -凝集素锚定在酵母细胞表面。

2.3 gp41 基因整合至酿酒酵母基因组

宿主菌酿酒酵母 MT8-1 为营养缺陷型(*ade*、*his3*、*leu2*、*trp1*、*ura3*)菌株,当带有 *Trp* 遗传标记的重组质粒整合至基因组后,重组菌株即可以在添加亮氨酸(Leu)、组氨酸(His)、腺嘌呤(Ade)和尿嘧啶(Ura)的选择性培养基 SDC 中生长。以筛选平板上生长的转化子 MT8-1/pICAS-His-gp41 为模板,转化子 MT8-1/pICAS 作为阴性对照,采用 Colony-PCR 鉴定,以 gp41 基因特异性引物进行扩增,经 1%凝胶电泳,可见在 450 bp 左右有条明显的带,即为 gp41 基因,这表明 gp41 基因已经整合至酿酒酵母基因组中。

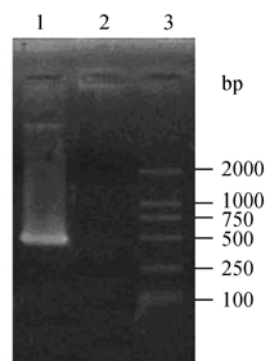


图 5 重组酵母转化子鉴定图

Fig. 5 Detection of recombinant yeast transformant

1: MT8-1/pICAS-His-gp41 as template; 2: MT8-1/pICAS as control; 3: DL2000 DNA marker

2.4 酵母细胞表面 His 标签的检测

采用免疫荧光分析的方法来检测 His 标签是否展示在酵母细胞表面,以鼠源 His 单克隆抗体作为一抗,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的 IgG 作为二抗。此二抗为 FITC 标记, FITC 为一种荧光物质,它不能透过细胞壁,所以被标记于酵母细胞的表面。此化学物质可以在波长为 492 nm 的激光下被激发,在 520 nm 波长处有吸收峰。经免疫荧光染色分析,阴性对照 MT8-1/pICAS 没有荧光产生,而 MT8-1/pICAS-His, MT8-1/pICAS-His-gp41 则被标记上了荧光(图 6)。荧光显微镜观察表明 His 标签已经展示在酵母细胞表面(图 7),流式细胞仪分析结果证实了与阴性对照比, MT8-1/pICAS-His, MT8-1/pICAS-His-gp41 的荧光峰均向右漂移(图 6),表明其细胞表面的平均荧光强度均强于对照,也证实了 His 标签已经展示在酵母细胞表面。

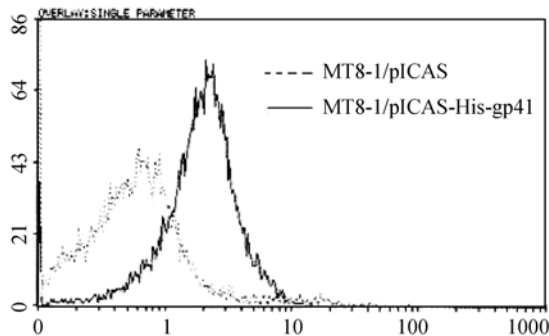
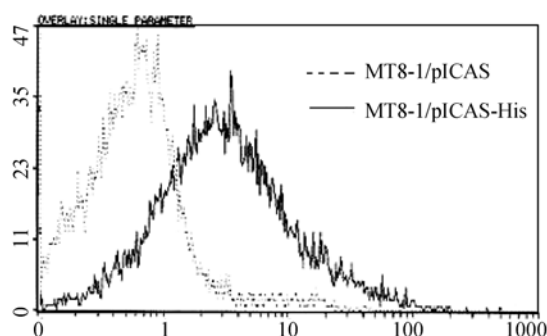


图 6 重组酵母表面 His 标签流式细胞仪检测图

Fig. 6 Flow cytometric histograms of His tag on the surface of recombinant yeast

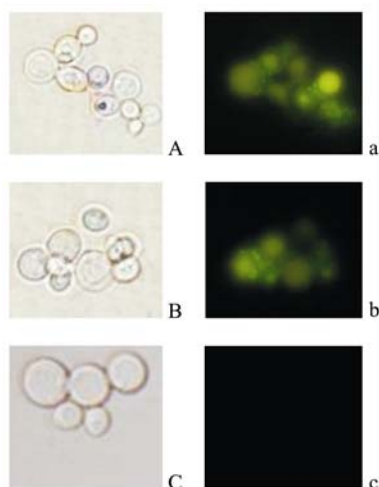


图7 免疫荧光标记重组酵母显微镜

Fig. 7 Microscopic observation of immunofluorescence labeled recombinant cells

A, B, C: phase contrast micrographs; a, b, c: fluorescence micrographs; A, a: MT8-1/pICAS-His; B, b: MT8-1/pICAS-His-gp41; C, c: MT8-1/pICAS

2.5 gp41 表达优化

用葡萄糖浓度分别为 1%、2%、3%、4% 的 SDC 培养基进行接种培养,每隔 12 h 分别取样检测,重组酵母 MT8-1/pICAS 为阴性对照。以鼠源 gp41 单克隆抗体为一抗,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的

IgG 为二抗,经流式细胞仪检测,结果用软件 Expo32 v1.2 分析,36 h 样品检测结果如图 7 所示。从左至右,葡萄糖浓度依次为 1%、2%、3%、4%。

由图 8 可见,相对阴性对照,MT8-1/pI CAS-His-gp41 荧光峰均有偏移,其中当葡萄糖浓度为 1%、2% 时,分别有 82.46% 和 63.64% 的细胞表达 gp41 抗原。随着葡萄糖浓度增加,表达受到抑制。表达 gp41 抗原的酵母占总细胞数的百分比从 82.46% 下降到 22.8%,由此可见高浓度的葡萄糖对蛋白的表达起到了抑制作用。当葡萄糖浓度为 0.5% 时,蛋白的表达量与浓度为 1% 时不相上下(流式图文中未提及);而菌体的生长量远远不及葡萄糖浓度为 1% 时。本实验利用 gp41 单克隆抗体能够检测到 gp41 活性,这表明抗原 gp41 在酵母细胞表面可形成空间立体结构,暴露出的抗原表位可以与单克隆抗体结合。从重组酵母生长曲线图(图 9)中可以看出,随着葡萄糖浓度的增加,细胞的生物量逐渐增加的,但是葡萄糖浓度的增加并没有使蛋白的表达提高。在葡萄糖浓度为 1% 时,82.46% 的酵母细胞表达了 gp41 蛋白,这对于以后应用酵母 ELISA 检测抗体起到了至关重要的作用。

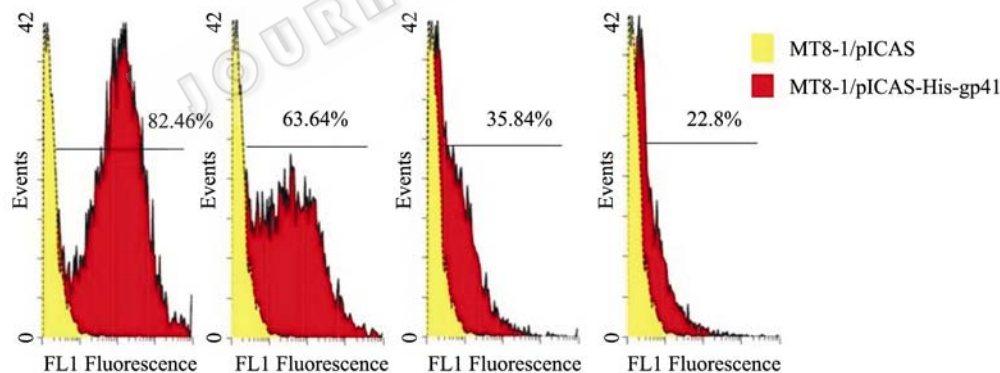


图8 不同葡萄糖浓度培养条件下重组酵母流式细胞仪检测图

Fig. 8 Flow cytometric histograms of recombinant yeast cultivated with glucose of different concentration

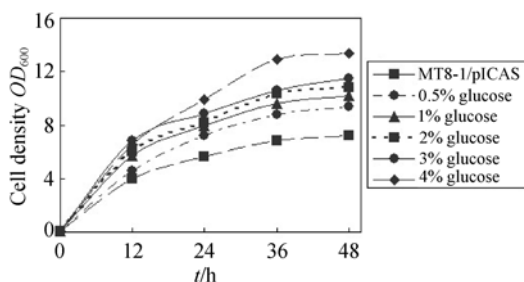


图9 不同葡萄糖浓度培养条件下重组酵母生长曲线图

Fig. 9 Growth curve of recombinant yeast cultivated with glucose of different concentration

3 讨论

酵母表面展示体系可采用流式细胞分选技术进行表面蛋白的高通量检测鉴定筛选。日本京都大学植田充美教授应用酵母表面展示技术成功筛选出高活性的酶^[12],成功将展示有活性物质的酵母应用于环境的改善^[13]等。利用酵母表面展示体系,美国麻省理工大学 Wittrup 教授成功筛选高活性的抗体^[14,15]。

本实验将 His 标签添加到穿梭载体 pICAS 中,

利用 α -凝集素展示在酿酒酵母细胞表面,并检测到标签的展示。在此基础上,成功构建了 gp41 酵母表面展示载体。在醋酸锂的作用下,整合到酿酒酵母染色体中,展示蛋白在葡萄糖启动子的作用下被诱导表达。采用免疫荧光染色的方法,分别以鼠源 His、gp41 单克隆抗体作为一抗,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的 IgG 作为二抗,进行细胞染色。实验结果表明,His 标签能在酵母细胞 MT8-1/pICAS-His, MT8-1/pI CAS-His-gp41 表面正确表达,结果由荧光显微镜分析得到。在不同浓度葡萄糖培养基培养 36 h 后,细胞取样检测,以鼠源 gp41 单克隆抗体为一抗,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 标记的 IgG 作为二抗进行免疫分析,相对于阴性对照,MT8-1/pICAS-His-gp41 的荧光峰均有偏移,当葡萄糖浓度为 1%、2%时,50%以上的细胞表面蛋白得到表达,而葡萄糖浓度达到 4%时,仅有 22%的细胞能检测到。以上结果表明 gp41 抗原已经成功地展示在酵母细胞表面,在优化条件下 82.46%的酵母细胞展示了 gp41 抗原蛋白,这为下一步进行酵母 ELISA 的研究提供了可能。

REFERENCES

- [1] Dong XN, Xiao Y, Dierich MP, *et al.* N-and C-domains of HIV-1 gp41: mutation, structure and functions. *Immunology Letters*, 2001, **75**(3): 215–220.
- [2] Chan DC, Fass D, Berger J M, *et al.* Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997, **89**(2): 263–273.
- [3] Muster T, Steindl F, Purtscher M, *et al.* A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 1993, **67**(11): 6642–6647.
- [4] Tumanova OY, Kuvshinov VN, Orlovskaya IA, *et al.* Immunogenic properties of peptides mimicking a HIV-1 gp41 epitope recognized by virus-neutralizing antibodies 2F5. *Molecular Biology*, 2003, **37** (3): 473–476.
- [5] Ravindranath MH, Bauer PM, Cornillez-Ty C, *et al.* Quantitation of the density of cell surface carbohydrate antigens on cancer cells with a sensitive cell-suspension ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 1996, **197** (1): 51–67.
- [6] Yang XY, Jiang HG, Hartmann WK, *et al.* Development of a quantitative antigen-specific cell-based ELISA for the 7G7/B6 monoclonal antibody directed toward IL-2R α . *Journal of Immunological Methods*, 2003, **277**(1-2): 87–100.
- [7] Lin Y, Shiraga S, Tsumuraya T, *et al.* Isolation of novel catalytic antibody clones from combinatorial library displayed on yeast-cell surface. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28** (6): 247–251.
- [8] Fujita Y, Katahira S, Ueda M, *et al.* Construction of whole-cell biocatalyst for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17** (5): 189–195.
- [9] Tamaru Y, Ohtsuka M, Kato K, *et al.* Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells: a first step for the development of an oral vaccine. *Biotechnology Progress*, 2006, **22**(4): 949–953.
- [10] Fukuda T, Ishikawa T, Ogawa M, *et al.* Enhancement of cellulase activity by clones selected from the combinatorial library of the cellulose-binding domain by cell surface engineering. *Biotechnology Progress*, 2006, **22**(4): 933–938.
- [11] Tajima M, Nogi Y, Fukasawa T. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene. *Yeast*, 1985, **1**: 67–77.
- [12] Shigechi H, Uyama K, Fujita Y, *et al.* Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting α -amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17** (3-5): 179–187.
- [13] Kuroda K, Shibasaki S, Ueda M, *et al.* Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **57**(5-6): 697–701.
- [14] Chao G, Cochran JR, Wittrup KD. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *Journal of molecular biology*, 2004, **342**(2), 539–550.
- [15] Lipovšek D, Lippow SM, Hackel BJ, *et al.* Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: Molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **368** (4): 1024–1041.