

## 鱼类传染性造血器官坏死病毒糖蛋白的酵母表面展示

赵景壮, 徐黎明, 刘 淼, 曹永生,  
尹家胜, 刘红柏, 卢彤岩\*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 糖蛋白(glycoprotein, G)是鱼类传染性造血器官坏死病毒的主要表面抗原, 是病毒检测及疫苗研制的主要靶基因。为了对其进行酵母表面展示, 本研究利用本实验室保存的含有IHNV-Sn1203毒株G基因的质粒为模板, PCR扩增富含抗原表位的糖蛋白基因片段后, 连接酵母表面展示载体pYD1, 构建重组质粒pYD1-G。将pYD1-G转化酿酒酵母EBY100细胞后, 利用半乳糖诱导G蛋白的表达。利用细胞免疫荧光、Western Blotting及流式细胞仪检测酵母表面G蛋白的表达情况。细胞免疫荧光结果显示, 转化了pYD1-G重组质粒的酵母细胞表面呈现出特异性荧光; Western Blotting结果显示, 经半乳糖诱导后G蛋白在酵母细胞表面获得了成功表达; 流式细胞仪检测结果表明, 随着半乳糖诱导时间的增加, G蛋白的表达量随之增加, 并在诱导48 h时达到峰值。以上研究表明G蛋白在酵母细胞表面获得了成功表达, 本研究为以酵母为活载体的新型口服疫苗的研制奠定了基础。

**关键词:** 传染性造血器官坏死病病毒; 糖蛋白; 真核表达; 酵母表面展示

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

传染性造血器官坏死病是由于鲑、鳟鱼类感染传染性造血器官坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)而引起的一种严重威胁鱼类的急性传染病<sup>[1-2]</sup>, 感染病毒的鱼苗及幼鱼在2~3周内的死亡率可达100%<sup>[3-4]</sup>, 对鲑、鳟养殖业造成了巨大的经济损失。IHNV基因组共编码病毒聚合酶蛋白、非结构蛋白、表面糖蛋白、基质蛋白、磷蛋白和病毒核衣壳蛋白6个蛋白<sup>[5-6]</sup>, 病毒表面的抗原即为表面糖蛋白(glycoprotein, G)。G蛋白在病毒与细胞受体的识别和结合过程中起到非常重要的作用<sup>[7-8]</sup>, 因此目前多针对G蛋白进行病毒检测、血清学分类及疫苗研制等研究。

酵母表面展示(yeast surface display)技术是继噬菌体展示技术发明以来的一种展示异源蛋白

的真核展示系统<sup>[9]</sup>, 酵母细胞对异源蛋白表达后将其运送至细胞外并利用二硫键将目的蛋白锚定于酵母细胞表面, 使其结构更加接近病毒表面的天然糖蛋白。由于抗原糖蛋白展示于酵母细胞表面, 利用其进行免疫时更加容易被免疫系统所识别, 并且酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞是食品/生物安全级的真核微生物, 不但能够对外源蛋白进行简单的翻译后加工修饰, 而且酵母本身也是很好的免疫佐剂成分, 这些优势使该系统成为口服疫苗研发的热门工具。

目前对于IHNV的研究较多<sup>[10-12]</sup>, 但仍未有将酵母表面展示技术应用于IHNV疫苗研发的报道。本研究利用酿酒酵母 $\alpha$ 凝集素表面展示系统对IHNV表面G蛋白进行表达, 并对G蛋白的表达

收稿日期: 2015-12-01 修回日期: 2016-04-14

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201410); 黑龙江省自然科学基金(C201462); 黑龙江省应用技术与开发计划(GA13B401)

通信作者: 卢彤岩, E-mail: lutongyan@hotmail.com

情况进行了全面检测。旨在通过该蛋白的成功表达及展示为以酵母作为活载体的新型口服疫苗的研制提供前期科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

酵母展示载体pYD1和酿酒酵母EBY100菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所惠赠; 含有IHNV-Sn1203毒株G基因的质粒、大肠杆菌(*E.coli*) DH5 $\alpha$ 为本实验室保存。限制性内切酶Taq DNA聚合酶、限制性内切酶*Kpn* I、*Xho* I、T<sub>4</sub>连接酶、克隆载体pMD18-T simple购自TaKaRa公司; 酵母质粒提取试剂盒、质粒DNA提取试剂盒及胶回收试剂盒购自OMEGA公司; Goat Anti-Rabbit IgG antibody H&L (HRP)、Goat Anti-Rabbit IgG antibody H&L (Cy3)购自Abcam公司; 兔抗G蛋白抗体由本实验室制备; 其他化学试剂为分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供。

### 1.2 实验方法

酵母展示G蛋白引物设计根据IHNV-Sn1203毒株G蛋白基因序列, 利用Primer Premier5.0对G蛋白基因序列进行分析, 并结合pYD1载体的多克隆位点序列分析设计引物用于G蛋白的酵母展示。上游引物pA: 5' GGTACCAGACACCATGATCACCACTCCG 3'加入*Kpn* I酶切位点(下划线标出); 下游引物pB: 5' CTCGAGTCAGGACCGTTTGCCAG 3'加入*Xho* I酶切位点(下划线标出), 扩增目的片段大小约为813 bp。

G蛋白酵母表面展示载体pYD1-G的构建 以实验室保存的IHNV糖蛋白基因G为模板, pA、pB分别为上、下游引物对G蛋白基因进行PCR扩增, 扩增后的产物经胶回收后连接pMD18-T simple载体进行测序。测序结果完全正确的pMD18-T-G质粒经双酶切后连接pYD1载体, 并将最终成功连接上G蛋白基因的pYD1载体命名为pYD1-G。

pYD1-G电转化酿酒酵母及转化子筛选 参照文献[13]的方法制备酿酒酵母EBY100感受态细胞, 并于EBY100感受态细胞中分别加入5  $\mu$ g pYD1空质粒及鉴定正确的pYD1-G质粒, 电击后立即加入1 mL预冷的1 mol/L山梨醇, 并转移到

1.5 mL灭菌管中30  $^{\circ}$ C培养1 h后涂布于YNB选择培养基(含亮氨酸, 不含色氨酸)上, 30  $^{\circ}$ C静置培养2 d。筛选出阳性转化子, 并分别命名为EBY100/pYD1和EBY100/pYD1-G。

酵母表面展示G蛋白的诱导表达 挑取筛选成功的阳性转化子于含有2%葡萄糖YNB-CAA培养基中, 30  $^{\circ}$ C振荡培养待其OD<sub>600</sub>值在2.0~5.0时, 4000 r/min离心8 min收集菌体。并在离心后的菌体中加入含有2%半乳糖的YNB-CAA培养基重悬酵母细胞, 并使其重悬后的OD<sub>600</sub>值在0.5~1.0。重悬后的酵母细胞于20  $^{\circ}$ C摇床中振荡培养, 诱导G蛋白的表达, 并分别在诱导后的0~60 h内取样, 鉴定目的蛋白的表达情况。

酵母表面展示G蛋白的Western Blotting分析 将诱导表达后的酵母细胞离心收集菌体, 经PBS洗涤2遍后按照文献[14]提供的方法对酵母细胞表面展示的G蛋白进行提取, 并将提取后的蛋白上清液进行12% SDS-PAGE凝胶电泳。电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 加入PBS(含有1%BSA)室温封闭1 h, PBS洗涤3遍后, 加入兔抗G蛋白抗体作为一抗、goat anti-rabbit IgG antibody H&L (HRP)作为二抗, 对酵母表面展示的G蛋白进行Western Blotting检测, 并以含有pYD1空质粒的酵母细胞诱导产物作为对照。

酵母表面展示G蛋白的免疫荧光检测 将不同时间段诱导后的酵母细胞离心收集菌体, 加入PBS洗涤3遍; 以兔抗G蛋白抗体作为一抗, 与细胞孵育1 h并经PBS洗涤后, 加入Goat Anti-Rabbit IgG antibody H&L (Cy3)作为二抗与酵母细胞孵育1 h, PBS洗涤后取酵母细胞滴于载玻片上, 并经盖玻片压实后利用倒置荧光显微镜进行免疫荧光检测。

酵母表面展示G蛋白的流式细胞仪检测 将诱导不同时间段的酵母细胞用PBS洗涤3遍, 用PBS重悬使细胞密度为2 $\times$ 10<sup>6</sup>个/mL, 加入兔抗G蛋白抗体作为一抗、goat anti-rabbit IgG antibody H&L (Cy3)作为二抗进行流式细胞仪检测, 并以未诱导的EBY100/pYD1-G菌株作为对照。

## 2 结果

### 2.1 酵母表面展示载体pYD1-G的构建

以pA、pB为上、下游引物, G蛋白基因序

列为模板进行G基因的PCR扩增，有明显特异性条带出现(图1)。将测序正确的pMD18-T-G质粒酶切后回收目的片段与pYD1载体连接，转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞后进行鉴定。可见清晰的G基因片段及pYD1载体条带(图2)，表明pYD1-G重组质粒构建成功。



图1 G基因扩增产物电泳图

1. 阴性对照; 2-3. G基因扩增片段; M. DL 2000分子量标准

Fig. 1 Agrose gel analysis of G gene PCR products

1. negative control; 2-3. PCR product of G gene; M. DL 2000 DNA marker

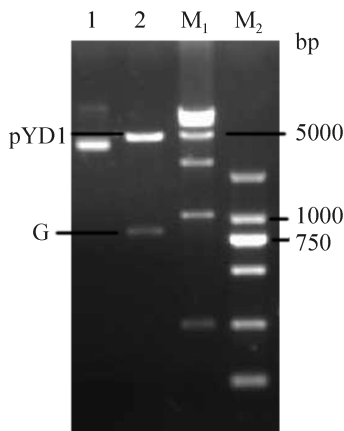


图2 pYD1-G重组质粒酶切鉴定

1. pYD1-G重组质粒; 2. 双酶切后的pYD1-G重组质粒; M<sub>1</sub>. DL 15 000分子量标准; M<sub>2</sub>. DL 2000分子量标准

Fig. 2 Identification of pYD1-G by dual-digestion

1. recombinant plasmid.; 2. dual-digestion plasmid; M<sub>1</sub>. DL 15 000 DNA marker; M<sub>2</sub>. DL 2000 DNA marker

## 2.2 pYD1-G电转化酿酒酵母及阳性转化子筛选

将鉴定正确的pYD1-G重组质粒及pYD1空质粒转化入酿酒酵母EBY100感受态细胞中，经YNB选择培养基筛选后，利用PCR的方法进行阳

性转化子的鉴定。由凝胶电泳结果可以看出pYD1-G重组质粒已经成功转入酵母感受态细胞中(图3)。

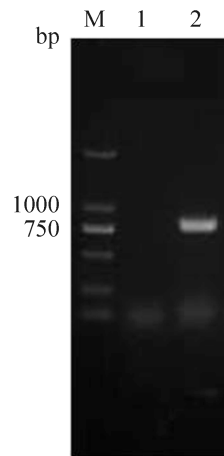


图3 pYD1-G重组质粒电转化酵母细胞的鉴定结果

1. 阴性对照; 2. 电转化酵母菌后的PCR产物; M. DL 2000分子量标准

Fig. 3 Agrose gel analysis after being transformed with EBY100

1. negative control; 2. PCR product after transformed with EBY100; M. DL 2000 DNA marker

## 2.3 酵母表面展示G蛋白Western Blotting 分析

按照文献[14]的方法提取酵母表面展示的G蛋白进行Western Blotting 分析，并以含有pYD1空质粒的酵母细胞诱导产物作为对照。经2%半乳糖诱导后，含有pYD1-G重组质粒的酵母细胞提取物出现了特异性的反应条带，而含有pYD1空质粒的酵母细胞诱导产物并未出现条带(图4)。由于重组质粒pYD1-G表达的G蛋白是以

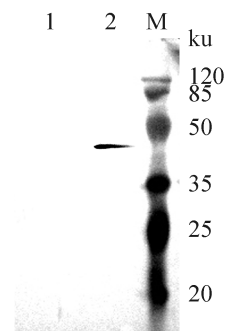


图4 酵母表达G蛋白的Western blotting鉴定

1. 阴性对照; 2. 酵母表面展示的G蛋白; M. 蛋白分子量标准

Fig. 4 Western blotting analysis of EBY100 displayed G protein

1. negative control; 2. G protein displayed on EBY100; M. prestained protein ladder

Aga2-G融合蛋白的形式展示于酵母细胞表面, 因此Western Blotting特异性条带大小在约42 ku处。Western Blotting结果表明酵母细胞成功表达了G蛋白。

#### 2.4 酵母表面展示G蛋白的免疫荧光检测

利用含有2%半乳糖的YNB-CAA培养基重悬酵母细胞进行G蛋白的诱导表达, 并分别在诱导后取样, 鉴定目的蛋白的表达情况。荧光显微镜观察结果显示, 转化了pYD1-G重组质粒的酵母细胞表面呈现出特异性红色荧光, 而转化pYD1空载体的酵母细胞表面并未见红色荧光(图版)。上述结果表明, 转化了pYD1-G重组质粒的酵母细胞成功表达并且表面展示了G蛋白。

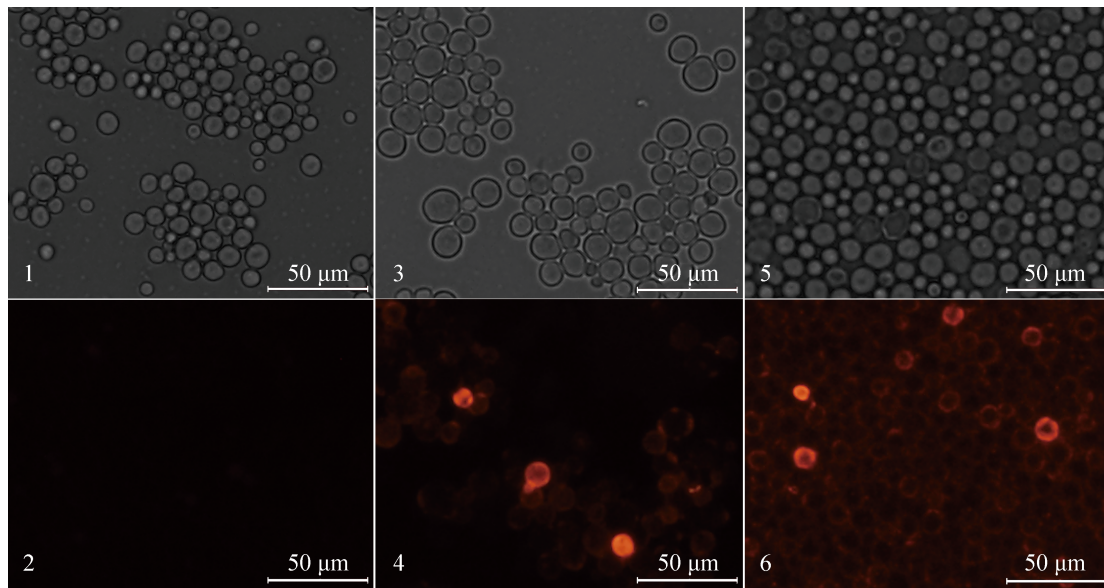
#### 2.5 酵母表面展示G蛋白的流式细胞仪检测

为了鉴定G蛋白是否成功展示于酵母细胞表面, 对诱导表达后的酵母细胞进行了流式细胞仪检测分析。取经2%半乳糖诱导后的酵母细胞, 进行流式细胞仪检测, 并以EBY100/pYD1-G未诱导菌株作为对照。结果显示EBY100/pYD1-G诱导菌株的荧光信号强度(诱导24、36、48和60 h 荧光强度分别为32%、54%、74%和75%)明显高

于EBY100/pYD1-G未诱导细胞所检测出的荧光信号强度(荧光强度2%); 随着诱导时间的增加, EBY100/pYD1-G诱导菌株荧光强度也随之增加, 并在诱导48 h后荧光强度达到最高值。结果表明G蛋白已经成功展示于酵母细胞EBY100的表面, 并且诱导的最佳时间为48 h(图5)。

### 3 讨论

传染性造血器官坏死病是威胁鲑、鳟鱼类的急性传染病<sup>[1-2]</sup>, 目前针对IHNV的疫苗研制主要有DNA疫苗、亚单位疫苗等。虽然DNA疫苗在加拿大已经商品化, 但存在着不足之处, 首先是免疫方法, 该疫苗采用注射法肌肉给药, 由于IHNV对0.2~0.6 g鱼致死性最高, 因鱼苗体型过小、免疫困难及大量免疫鱼苗中工作量大、费时费力带来的问题, 在一定程度上限制了疫苗的广泛应用; 其次是安全性问题, 该疫苗采用的载体含有pCMV启动子, 存在重组整合到人体的危险。而亚单位疫苗的研制方面, 目前的研究多采用原核的方式对IHNV表面的G蛋白进行表达<sup>[10-12]</sup>, 由于原核细胞无法对真核蛋白进行必要的翻译后修饰, 表达后的G蛋白都为包涵体



图版 酵母细胞表面展示G蛋白的免疫荧光检测

1, 2. 转化pYD1空载体的酵母细胞; 2. 荧光检测结果; 3, 4. 转化pYD1-G重组质粒的酵母细胞诱导24 h; 4. 荧光检测结果; 5, 6. 转化pYD1-G重组质粒的酵母细胞诱导48 h; 6. 为荧光检测结果

#### Plate Fluorescence detection of EBY100 expressed G protein

1, 2. yeast cell transformed with pYD1 control vector; 2. served as fluorescence result; 3, 4. yeast cell induced for 24 h after transformed with pYD1-G vector; 4. served as fluorescence result; 5, 6. yeast cell induced for 48 h after transformed with pYD1-G vector; 6. served as fluorescence result

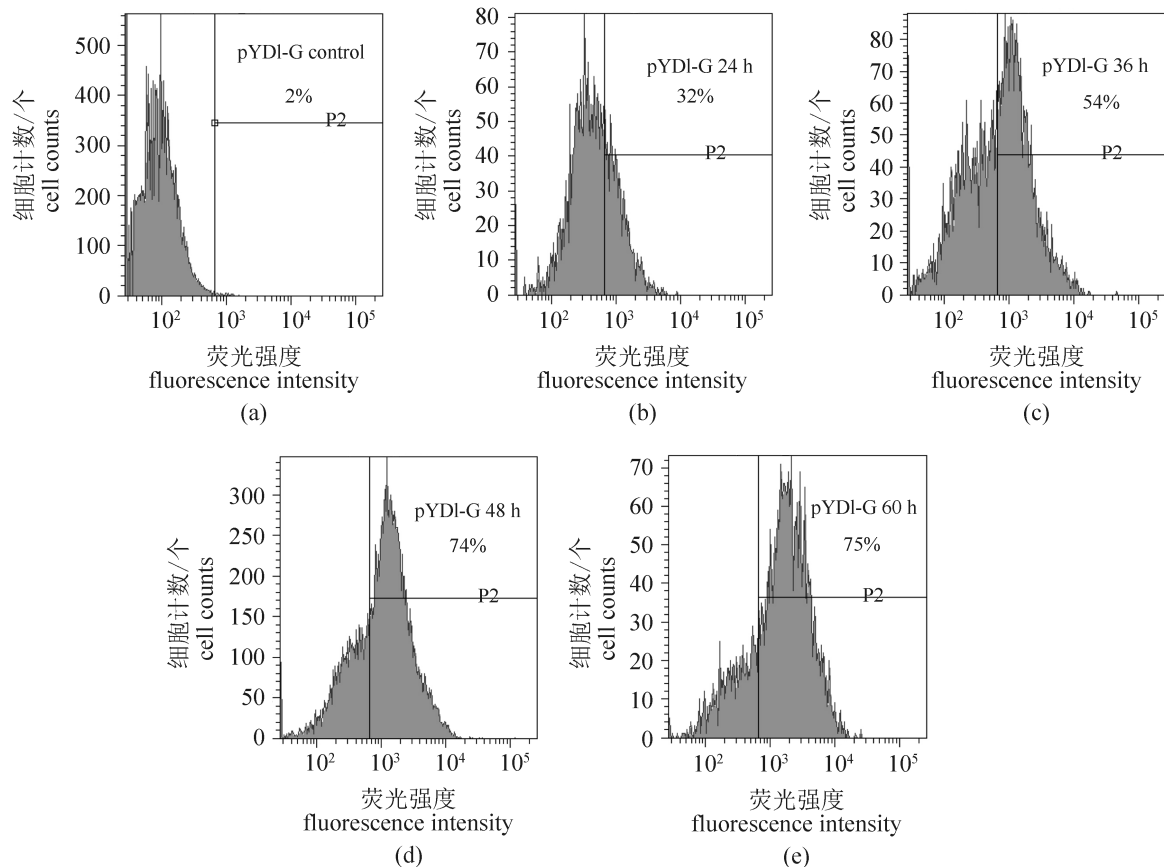


图5 酵母表面展示G蛋白的流式细胞仪检测

(a)转化pYD1-G但未经诱导的酵母细胞；(b)转化pYD1-G后诱导24 h的酵母细胞；(c)转化pYD1-G后诱导36 h的酵母细胞；(d)转化pYD1-G后诱导48 h的酵母细胞；(e)转化pYD1-G后诱导60 h的酵母细胞

Fig. 5 The flow cytometry analysis of EB Y100 yeast strain transformed with pYD1-G plasmid and incubated in galactose

(a) yeast cell transformed with pYD1-G without induction; (b) yeast cell induced for 24 h after transformed with pYD1-G; (c) yeast cell induced for 36 h after transformed with pYD1-G; (d) yeast cell induced for 48 h after transformed with pYD1-G; (e) yeast cell induced for 60 h after transformed with pYD1-G

的形式，变性、复性后并不能完全保持天然糖蛋白的生物学活性。因此利用真核细胞表达G蛋白，研制新型的疫苗成为现阶段的研究热点。

酵母展示是近些年发展起来的真核细胞展示异源蛋白技术，其主要包括 $\alpha$ 凝集素和 $\alpha$ 凝集素展示系统，异源蛋白通过结合在 $\alpha$ 凝集素的C端或 $\alpha$ -凝集素的N端以融合蛋白的形式表达并展示于酵母细胞表面<sup>[15]</sup>。酵母细胞作为真核细胞生物与以往研究中常用的原核表达生物相比，能够对异源蛋白在表达后进行糖基化、二硫键的异构化等翻译后的修饰及加工，这种表达特性使得表达后的异源蛋白能够具有类似于天然状态的生物学活性<sup>[16-18]</sup>。由于酿酒酵母在其生长的过程中并不会产生毒素，安全可靠，是具有生物/

食品安全级的真核微生物，目前已经被用于乙型肝炎疫苗、人胰岛素、人粒细胞集落刺激因子等的研究中<sup>[19-21]</sup>。

Schreuder等<sup>[22]</sup>研究发现，利用展示抗原的酵母细胞腹腔免疫小鼠后得到了特异性高的乙肝病毒抗体。这一结果表明酵母细胞表面展示病毒抗原不但能够保持抗原蛋白原有的生物学活性，而且成功刺激机体产生高特异性的抗体。Ananphongmanee等<sup>[23]</sup>将Rab7和VP28两种蛋白展示于酵母细胞表面，并希望通过口服免疫的方法来达到预防对虾白斑综合征病毒的目的(white spot syndrome virus, WSSV)。同样地Zhu等<sup>[24]</sup>将哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)来源的血溶素表达于酵母细胞表面应用于鱼类的口服免疫，结果显示

其免疫效果达到了60%。以上结果均表明, 利用酵母表面展示目的蛋白的方法对实验动物进行口服免疫都能够获得明显的保护效果。本研究克隆了IHNV表面糖蛋白的G基因, 将其构建到了pYD1展示载体上并转化酿酒酵母EBY100细胞对G蛋白进行真核表达。研究结果显示, 与转化pYD1空载体的酵母细胞相比, 经半乳糖诱导后转化了pYD1-G重组质粒的酵母细胞表面呈现出特异性荧光。利用流式细胞仪对不同诱导时间的酵母细胞进行检测, 随着诱导时间的增加, 酵母细胞表面G蛋白的展示量也随之增加, 在诱导了48 h后达到峰值。以上结果均表明G蛋白已经成功展示于酵母细胞表面, 并为以酵母为活载体的新型口服疫苗的研制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] LaPatra S E. The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1996, 6: 15-28.
- [2] Wolf K. Infectious hematopoietic necrosis virus[M]//Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1988: 83-114.
- [3] St-Hilaire S, Ribble C S, Stephen C, *et al.* Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada[J]. Aquaculture, 2002, 212(1-4): 49-67.
- [4] 刘淼, 徐黎明, 卢彤岩, 等. 鱼类传染性造血器官坏死病毒RT-LAMP检测方法的建立及应用[J]. 中国水产科学, 2014, 21(5): 1065-1071.
- Liu M, Xu L M, Lu T Y, *et al.* Development and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of IHNV[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(5): 1065-1071 (in Chinese).
- [5] 刘蕊, 范万红, 史秀杰, 等. 国内养殖鱼类和进境鱼卵中传染性造血器官坏死病毒(IHNV)的检测及基因分析[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 544-549.
- Liu H, Fan W H, Shi X J, *et al.* Detection and genetic analysis of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) from cultured fish and imported fish larvae[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(5): 544-549 (in Chinese).
- [6] Morzunov S P, Winton J R, Nichol S T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Virus Research, 1995, 38(2-3): 175-192.
- [7] Emmenegger E J, Meyers T R, Burton T O, *et al.* Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2000, 40(3): 163-176.
- [8] Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, *et al.* Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout[J]. Virology, 1998, 249(2): 297-306.
- [9] Lee S Y, Choi J H, Xu Z H. Microbial cell-surface display[J]. Trends Biotechnology, 2003, 21(1): 45-52.
- [10] 赵景壮, 徐黎明, 刘淼, 等. 鱼类传染性造血器官坏死病毒糖蛋白的截短表达及免疫原性检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(12): 1238-1242.
- Zhao J Z, Xu L M, Liu M, *et al.* Expression and immunogenicity analysis of truncated glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus in fish[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2014, 30(12): 1238-1242 (in Chinese).
- [11] 徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白原核表达及免疫原性分析[J]. 病毒学报, 2013, 29(5): 529-534.
- Xu L M, Liu H B, Yin J S, *et al.* Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of glycoprotein from infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2013, 29(5): 529-534 (in Chinese).
- [12] 刘学光, 郑怀东, 郭欣硕, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 254-258.
- Liu X G, Zheng H D, Guo X S, *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of glycoprotein gene in infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(3): 254-258 (in Chinese).
- [13] 叶玲, 刘建伟, 刘静. 酿酒酵母感受态细胞的低温保存及酵母菌落PCR-快速筛选鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6): 956-959.
- Ye L, Liu J W, Liu J. Frozen storage of competent yeast cells and simple procedure for PCR screening yeast recombinant clones[J]. Progress in Biochemistry and

- Biophysics, 2003, 30(6): 956-959 (in Chinese).
- [14] Andreu C, del Olmo M. Yeast arming by the Aga2p system: Effect of growth conditions in galactose on the efficiency of the display and influence of expressing leucine-containing peptides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9055-9069.
- [15] Ueda M, Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface[J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(2): 121-140.
- [16] 郭波, 谢佩蓉, 邹强, 等. 酵母表面展示系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(1): 19-22.  
Guo B, Xie P R, Zou Q, *et al.* Progress in yeast surface display system[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(1): 19-22 (in Chinese).
- [17] Blazic M, Kovacevic G, Prodanovic Q, *et al.* Yeast surface display for the expression, purification and characterization of wild-type and B11 mutant glucose oxidases[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 89(2): 175-180.
- [18] Lin S, Houston-Cummings N R, Prinz B, *et al.* A novel fragment of antigen binding (Fab) surface display platform using glycoengineered *Pichia pastoris*[J]. Journal of Immunological Methods, 2012, 375(1-2): 159-165.
- [19] Kazemi Seresht A, Cruz A L, de Hulster E, *et al.* Long-term adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the burden of recombinant insulin production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(10): 2749-2763.
- [20] Kniskern P J, Hagopian A, Burke P, *et al.* Characterization and evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine expressed in yeast defective for N-linked hyperglycosylation[J]. Vaccine, 1994, 12(11): 1021-1025.
- [21] Simon B, Nomellini J, Chiou P, *et al.* Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: Production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 44(1): 17-27.
- [22] Schreuder M P, Deen C, Boersma W J A, *et al.* Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: Implications for a possible oral vaccine[J]. Vaccine, 1996, 14(5): 383-388.
- [23] Ananphongmanee V, Srisala J, Sritunyalucksana K, *et al.* Yeast surface display of two proteins previously shown to be protective against white spot syndrome virus (WSSV) in Shrimp[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128764.
- [24] Zhu K L, Chi Z M, Jing L, *et al.* The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish[J]. Vaccine, 2006, 24(35-36): 6046-6052.

## Yeast surface display system of infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein

ZHAO Jingzhuang, XU Liming, LIU Miao, CAO Yongsheng,  
YIN Jiasheng, LIU Hongbai, LU Tongyan\*

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** Glycoprotein is the most important surface antigen of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), and it has been served as the major gene for virus detection and vaccine development. The specific PCR primers for IHNV glycoprotein gene replication were designed based on the plasmid containing IHNV-Sn1203 glycoprotein gene. The PCR product was ligated to yeast surface display vector pYD1 and the recombinant plasmid pYD1-G was transformed into EBY100 cell. The transformed EBY100/pYD1-G cell was induced by galactose and the protein expression was detected by cell immunofluorescence, Western Blotting and flow cytometry. The cell immunofluorescence result showed that the transformed EBY100 cell presented a red fluorescence, and Western blotting analysis obtained a specific glycoprotein band. Both of these two results indicated that the glycoprotein was successfully displayed on the surface of yeast cell. The flow cytometry analysis showed that the glycoprotein expression was increased with the galactose induced time, and the maximum expression was obtained at 48 h. The successful display of glycoprotein on the yeast surface laid a foundation for live oral vaccine development.

**Key words:** infectious hematopoietic necrosis virus; glycoprotein; eukaryotic expression; yeast surface display

**Corresponding author:** LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hotmail.com

**Funding projects:** Central-Level Non-profit Scientific Research Institutes Special Funds (HSY201410); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C201462); Heilongjiang Province Research and Development of Applied Technology (GA13B401)