

网络出版时间:2016-06-08 16:21

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.07.007

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1621.014.html>

新城疫病毒 HN 蛋白酵母双杂交 诱饵载体的构建及鉴定

胡湘云,高小龙,付向晶,王燕平,刘丹丹,常旭东,
刘 蓬,杜恩岐,王兴龙,党如意,杨增岐

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**应用酵母双杂交技术构建新城疫病毒的血凝素-神经氨酸酶(HN)蛋白线性中和表位区的诱饵载体 pGBKT7-HN-neu,为筛选靶向新城疫病毒 HN 蛋白的中和性纳米抗体奠定基础。**【方法】**合成 HN 蛋白的线性中和表位区 HN-neu,将其克隆至酵母双杂交系统诱饵载体 pGBKT7 中,构建诱饵载体 pGBKT7-HN-neu,经酶切鉴定和测序验证正确后,将 pGBKT7-HN-neu 转化酵母菌 Y2H Gold,检测其在酵母细胞中的毒性和自激活作用。**【结果】**成功合成了 HN-neu,构建的 pGBKT7-HN-neu 在酵母细胞 Y2H Gold 中无毒性及自激活能力。**【结论】**成功构建了诱饵载体 pGBKT7-HN-neu。

[关键词] 新城疫病毒;HN 蛋白;酵母双杂交系统;诱饵载体

[中图分类号] S852.65

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)07-0045-05

Construction and identification of HN bait vector of newcastle disease virus in yeast two-hybrid system

HU Xiangyun,GAO Xiaolong,FU Xiangjing,WANG Yanping,LIU Dandan,
CHANG Xudong,LIU Peng,DU Enqi,WANG Xinglong,
DANG Ruyi,YANG Zengqi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The recombinant bait vector pGBKT7-HN-neu was constructed by yeast two-hybrid system to select variable domain of heavy chain antibody (VHH) against newcastle disease virus (NDV) HN protein. **【Method】**The neutralizing epitope of NDV HN protein was synthesized and cloned into bait vector pGBKT7 of yeast two-hybrid system. After being verified by enzyme digestion and sequencing, pGBKT7-HN-neu was transformed into yeast cells Y2H Gold. Then, self-activation and toxic action of the bait vector pGBKT7-HN-neu were tested. **【Result】**HN-neu was successfully synthesized and the recombination bait vector pGBKT7-HN-neu was proven to be no self-activation and not toxic to the host yeast cell. **【Conclusion】**The bait vector pGBKT7-HN-neu was successfully constructed.

Key words: newcastle disease virus (NDV); hemagglutinin-neuraminidase (HN); yeast two-hybrid system; bait vector

[收稿日期] 2014-11-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31272578)

[作者简介] 胡湘云(1990—),女,广西南宁人,在读硕士,主要从事动物传染病学及基因工程抗体研究。

E-mail: 821995274@163.com

[通信作者] 杨增岐(1964—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病学研究。E-mail: yzq8162@163.com

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种禽类急性、高度接触性、致死性传染病,在世界范围内广泛流行,是危害养禽业的主要传染病之一^[1]。NDV 属于副粘病毒科禽腮腺炎病毒属,为单股负链 RNA 病毒^[2]。NDV 基因组包含 6 个开放阅读框架(ORF),编码 6 种结构蛋白,分别为核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN)和大蛋白(L),其编码基因排列顺序是 3'-NP-P-M-F-HN-L-5',其中 HN 是位于 NDV 病毒粒子表面囊膜上的一种纤突蛋白,是病毒进入宿主细胞的必需成分之一^[3]。HN 具有血凝素和神经氨酸酶 2 种活性,能诱导机体产生中和性抗体,在机体抗感染免疫中起着重要作用,尤其是其中和表位是免疫保护作用的核心靶点,是研究和控制新城疫的最佳切入点^[4]。相关研究显示,新城疫病毒 HN 结构蛋白的一个潜在线性中和表位区为 346—353aa(DEQDYQIR)^[5-8],其氨基酸序列在一级结构上是连续的,可以在体外模拟。

近年来,随着基因工程技术的迅速发展,一种新型抗体——重链抗体重链可变区(Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody, VHH)的出现逐渐引起科研工作者的关注^[9],其抗原结合位点仅由重链的可变区 VHH 单结构域形成,且高度仅为 4.8 nm 左右,直径仅为 2.2 nm 左右,故又被称为纳米抗体(Nanobodies, Nbs)。由于纳米抗体的单链性质使其较普通抗体具有一些独特的性质,如易于表达、高水溶性和稳定性、能识别独特的构造表位、具有较高的亲和力、免疫原性低等,因此成为抗体研究的热点^[10]。目前主要利用噬菌体表面展示技术、酵母双杂交技术和核糖体展示技术进行纳米抗体的研究。酵母双杂交技术作为验证蛋白互作的主流技术,也可用来鉴定抗原抗体的反应。本实验室应用酵母双杂交技术已成功构建双峰驼免疫酵母双杂交纳米抗体文库,并筛选出靶向圆环病毒的纳米抗体^[11]。

本研究以新城疫病毒 HN 蛋白的线性中和表位区为研究对象,将其与酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合功能域(DNA binding domain, DNA-BD)重组在一起构建酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-HN-neu,并对构建的诱饵载体进行毒性和自激活活性检测,以期从新城疫酵母双杂交纳米抗体文库中筛选靶向 HN 蛋白的纳米抗体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 SD/(-Trp, DDO(-Trp-Leu)、QDO(-Trp-Leu-His-Ade)选择性培养基、YPD 培养基、50% PEG 3350、10×TE、10×LiAC、9 g/L NaCl 溶液、Yeastmaker Carrier DNA、3 mol/L 醋酸钠溶液、X-α-Gal 及 Aureobasidin A 等试剂均购自 Clontech;二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma;琼脂糖购自 Invitrogen;EcoR I、Sal I 核酸限制性内切酶购自 Fermentas;2K plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自 OMEGA;凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN。其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 菌株、毒株、载体及文库 Y2H Gold 酵母菌及 pGADT7-T、pGBKT7、pGBKT7-Lam、pGBKT7-53 载体均购自 Clontech 公司。DH5α 感受态细胞、双峰驼新城疫病毒酵母双杂交纳米抗体文库均由本实验室构建与保存。

1.2 方法

1.2.1 线性中和表位区的合成 根据 GenBank 数据库中公布的 NDV LaSota 株 HN 基因序列,并参考文献[5-8]报道的 HN 潜在线性中和表位(epitope)的氨基酸序列(DEQDYQIR),设计一段由 linker(GGGS)串联的线性中和表位片段,命名为 HN-neu,在该片段首端、末端分别引入 EcoR I、Sal I 酶切位点,片段序列为:5'-GAATTCGGTGTGTTCCGATGAACAGGATTACCAAATCCGTGGTGGTGGTTCGATGAACAGGATTACCAAATCCGTGGTGGTGGTTCGATGAACAGGATTACCAAATCCGTTAAGTCGAC-3', 5' 和 3' 端下划线部分分别为 EcoR I、Sal I 酶切位点。片段由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2.2 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 的构建 将合成的带中和表位区的质粒 HN-neu 和 pGBKT7 载体分别用 EcoR I、Sal I 进行双酶切,用胶回收试剂盒回收切出的目的条带,用 T4 连接酶于 16℃ 连接过夜。连接产物使用 YC 法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,涂布于 LB 固体平板(含 100 mg/mL 卡那霉素)培养,直到有菌落出现,挑单菌落接种于 LB 液体培养基(含 100 mg/mL 卡那霉素)中,于 37℃、220 r/min 振荡培养 12 h,按质粒提取试剂盒操作步骤说明提取质粒,进行 EcoR I、Sal I 双酶切鉴定,将鉴定呈阳性的质粒送南京金斯瑞公司进行测

序,测序正确的质粒即为诱饵载体,命名为 pG-BKT7-HN-neu。

1.2.3 诱饵载体对 Y2H Gold 酵母菌的转化 用 PEG/LiAC 方法制备酵母感受态细胞,将冻存的 Y2H Gold 酵母菌划线接种至 YPDA 平板,于 30 ℃ 倒置培养 3 d,挑取直径为 2~3 mm 的单菌落于 3 mL YPDA 液体培养基中,30 ℃、220 r/min 振荡培养 8~12 d,取 20 μ L 接种于 50 mL YPDA 培养基中进行扩大培养,30 ℃、220 r/min 振荡培养 16~20 h。当 OD₆₀₀ 为 0.15~0.30 时,700 g 离心 5 min,弃上清,沉淀重悬于 100 mL YPDA 中,30 ℃ 孵化 3~5 h 直到 OD₆₀₀ 为 0.40~0.50。将上述 100 mL 培养液分装至 2 个 50 mL 无菌锥形瓶,室温 700 g 离心 5 min,弃上清,每管用 30 mL 灭菌蒸馏水重悬,室温 700 g 离心 5 min,弃上清,每管用 1.5 mL 1.1×TE/LiAC 重悬,转移细胞悬液到 2 个 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min 离心 15 s,弃去上清,每管用 600 μ L 1×TE/LiAC 重悬细胞,即得酵母感受态细胞。

将 100 ng 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu、5 μ L Yeastmaker Carrier DNA(10 μ g/ μ L,沸水加热 10 min 后置于冰上备用)、50 μ L 酵母感受态细胞和 500 μ L PEG/LiAC 溶液混合在一起,同时设空载体 pGBKT7 对照。混合后涡旋振荡 10 s,30 ℃ 培养箱中孵育 45 min,每隔 15 min 混匀 1 次,加入 160 μ L DMSO 混匀,42 ℃ 热激 20 min,每隔 10 min 混匀 1 次,室温 700 g 离心 5 min,弃去上清,收集菌体。用 100 μ L 0.9% 氯化钠溶液重悬菌体,涂布 SD/-Trp 营养选择性固体平板,30 ℃ 倒置培养 3~5 d。

1.2.4 诱饵载体的自激活作用检测 吸取 100 μ L 上述转化 pGBKT7-HN-neu 的 Y2H Gold 酵母菌液 3 份,分别均匀涂布 SD/-Trp 平板、SD/-Trp/X- α -Gal 平板和 SD/-Trp/AbA/X- α -Gal 平板,30 ℃ 培养 3~5 d。观察酵母菌生长情况,直到有菌落长出,检测诱饵蛋白是否具有自激活作用。试验同时设空载体 pGBKT7 对照(培养基为 SD/-Trp)、阳性载体 pGBKT7-53+ pGADT7-T 对照(培养基为 DDO/-Trp-Leu/AbA/X- α -Gal)和阴性载体 pGBKT7-lam+ pGADT7-T 对照(培养基为 DDO/-Trp-Leu/AbA/X- α -Gal)。

1.2.5 诱饵载体的毒性检测 从 SD/-Trp 平板上分别挑取已转化成功的 pGBKT7-HN-neu 和空载体 pGBKT7 的 Y2H Gold 单克隆接种于 5 mL SD/-Trp(含 50 μ g/mL 卡那霉素)液体培养基中,30 ℃ 下 220 r/min 振荡培养 16~20 h,分别于 0,4,8,12,

16 和 20 h 取样,用紫外分光光度计测其在 600 nm 波长下的吸光度(OD₆₀₀)值,检验诱饵蛋白是否有毒性。若 OD₆₀₀ < 0.8,说明重组诱饵载体 pG-BKT7-HN-neu 对 Y2H Gold 酵母细胞可能有毒性,反之则没有毒性。

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-HN-neu 的鉴定

重组诱饵质粒 pGBKT7-HN-neu 用 *Eco*R I 和 *Sal* I 限制性内切酶双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳分析,得到 123 bp 的目的条带(图 1),与预期结果一致。DNA 序列分析结果与设计的序列完全一致,表明诱饵重组质粒构建正确,可用于后续试验。

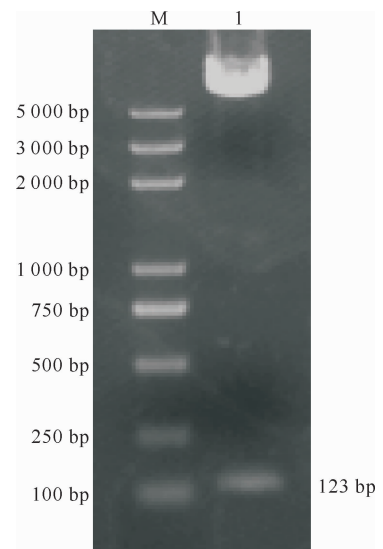


图 1 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 的酶切鉴定
M. 2K plus DNA 相对分子质量标准;

1. 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 酶切产物

Fig.1 Identification of pGBKT7-HN-neu by restriction enzyme digestion

M. 2K plus DNA Marker; 1. Product from pGBKT7-HN-neu digested with *Eco*R I and *Sal* I

2.2 诱饵质粒转化 Y2H Gold 酵母菌

将转有 pGBKT7-HN-neu 诱饵质粒的 Y2H Gold 菌涂布于 SD/-Trp 营养选择性固体平板,3~5 d 后有白色菌落生长,说明诱饵质粒已成功转化到 Y2H Gold 酵母中。

2.3 诱饵载体的自激活作用

诱饵载体的自激活作用检测结果见表 1。由表 1 可知,转化 pGBKT7-HN-neu 的 Y2H Gold 在 SD/-Trp 平板和 SD/-Trp/X- α -Gal 平板上长出白色菌落,在 SD/-Trp/AbA/X- α -Gal 平板上无菌落生长;空载体 pGBKT7 对照平板上长出白色菌落,阳

性载体 pGBKT7-53+pGADT7-T 对照平板上长出蓝色菌落,而阴性载体 pGBKT7-lam+pGADT7-T 对照平板无菌落生长,对照组结果成立。上述结果

表 1 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 对报告基因的自激活检测

Table 1 Autoactivity test of bait vector pGBKT7-HN-neu to the reporter genes

处理 Treatment	载体 Vector	培养基 Medium type	菌落 Colony
自激活检测 Autoactivity test	pGBKT7-HN-neu	SD/-Trp	白色菌落 White colony
	pGBKT7-HN-neu	SD/-Trp/X-α-Gal	白色菌落 White colony
	pGBKT7-HN-neu	SD/-Trp/AbA/X-α-Gal	不生长 No colony
空载体对照 Vector control	pGBKT7	SD/-Trp	白色菌落 White colony
阳性对照 Positive control	pGBKT7-53+pGADT7-T	DDO/-Trp-Leu/AbA/X-α-Gal	蓝色菌落 Blue colony
阴性对照 Negative control	pGBKT7-lam+pGADT7-T	DDO/-Trp-Leu/AbA/X-α-Gal	不生长 No colony

2.4 诱饵载体的毒性检测

由图 2 可知,诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 和空载体 pGBKT7 处理的 OD₆₀₀ 值相近,振荡培养 16 h 时,诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 和空载体 pGBKT7 处理的 OD₆₀₀ 分别为 1.303 和 1.357,均大于 0.8。结果表明,诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 表达的 DNA-BD 融合蛋白对酵母菌 Y2H Gold 的生长无毒性。

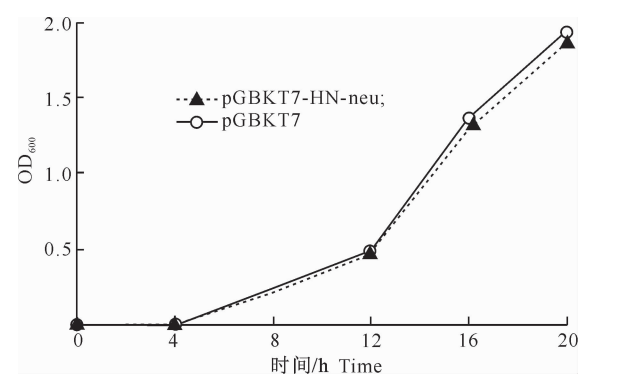


图 2 诱饵载体 pGBKT7-HN-neu 对酵母细胞 Y2H Gold 的毒性检测

Fig. 2 Toxicity of pGBKT7-HN-neu to Y2H Gold yeast cell

3 讨论

新城疫病毒的血凝素-神经氨酸酶(HN)蛋白在病毒侵染过程中能识别细胞受体并介导病毒吸附细胞膜,此外,它还参与影响病毒毒力^[12]。HN 蛋白是 NDV 的重要保护性抗原,试验证明其单克隆抗体能中和 NDV 的感染^[13]。由于单克隆抗体制备过程对技术人员的细胞操作技术要求高,且在实际生产中大量高浓度抗体的制备难度大、成本高。近年来,随着基因工程技术发展,相继开展了 NDV 新型基因工程抗体的研究。王斌等^[14]通过构建 HN-scFV 原核表达载体在大肠杆菌中表达获得具有生物活性的 HN 蛋白单链抗体。但目前尚未见到关

表明,诱饵质粒 pGBKT7-HN-neu 在 Y2H Gold 酵母细胞中对报告基因 *Ade*、*His*、*Leu* 和 *LacZ* 无自激活活性,可用于后续酵母双杂交的筛选试验。

于 HN 蛋白中和性基因工程抗体的报道。纳米抗体是基于骆驼体内天然存在的重链抗体获得的具有亲本抗体抗原结合活性的一种基因工程抗体;由于 VHH 分子量小、稳定、易制备、免疫原性小以及能识别独特的表位等优点,使其在抗病毒中的研究成为热点,如 VHH 已用于人类免疫缺陷病毒等多种病毒性疾病的诊断和治疗^[15],因此,研制靶向 NDV HN 蛋白的中和性纳米抗体为今后控制和治理新城疫提供了一个崭新的方向。

酵母双杂交技术是建立在真核表达基础上验证蛋白互作的一个有力工具,也可用于目标蛋白抗体的筛选。相对于噬菌体展示技术,利用酵母双杂交技术筛选特定抗原的 VHH 时,在筛选过程中,抗原不需要表达和纯化,可在核酸水平操作。本试验直接选取 HN 蛋白的潜在线性中和表位(DEQDYQ-IR)作为抗原,通过酶切连接构建用于酵母双杂交筛选的诱饵载体 pGBKT7-HN-neu。通过将转化诱饵载体的酵母细胞在不同营养缺陷型平板上进行培养,观察其生长情况和颜色变化,在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X-α-Gal 平板上为白色菌落,在 SD/-Trp/AbA/X-α-Gal 平板上无菌落生长,直观地判断诱饵载体对报告基因无自激活作用,从而排除假阳性。同时转化诱饵载体的酵母细胞在 SD/-Trp 液体培养基中能大量增殖,OD₆₀₀ 值大于 0.8,说明表达的诱饵蛋白对酵母菌无毒性作用。上述试验结果表明,本研究成功构建了 HN 蛋白的诱饵载体 pGBKT7-HN-neu,且所构建的诱饵载体在酵母系统中无自激活和毒性作用,为利用酵母双杂交系统筛选靶向 NDV HN 蛋白的中和性纳米抗体奠定了基础。

[参考文献]

[1] Alexander D J. Newcastle disease and other avian paramyxovir-

- uses [J]. *Rev Sci Tech*, 2000, 19: 443-462.
- [2] Mayo M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. *Arch Virol*, 2002, 147: 1655-1663.
- [3] Gravel K A, Morrison T G. Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus [J]. *J Virol*, 2003, 77 (20): 110402-110409.
- [4] Corey E A, Mirza A M, Levandowsky E. Fusion deficiency induced by mutations at the dimer interface in the newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase is due to a temperature-dependent defect in receptor binding [J]. *J Virol*, 2003, 77 (12): 6913-6922.
- [5] Chambers P. Location of a neutralizing epitope for the haemagglutinin-neuraminidase glycol protein of newcastle disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69: 2115-2122.
- [6] Iorio R M, Bratt M A. Monoclonal antibodies to newcastle disease virus; delineation of four epitopes on the HN glycoprotein [J]. *Journal of Virology*, 1983, 48(2): 440-450.
- [7] Iorio R M, Syddall R J, Sheehan J P, et al. Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of NDV; domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition [J]. *J Virol*, 1991, 65(9): 4999-5006.
- [8] Liu Y, Meng C, Liu X F. Identification of a variable epitope on the newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140(1/2): 92-97.
- [9] Hamerscatterman T, Atarhouch S, Muyldermans G, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light-chains [J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [10] Harmsen M M, De Haard H J. Properties, production and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. *Appl Microbial Biotechnol*, 2007, 77(1): 13-22.
- [11] Fu X J, Gao X L, He S F, et al. Design and selection of a camelid single-chain antibody yeast two-hybrid library produced de novo for the cap protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): 1-10.
- [12] Tan L T, Xu H Y, Wang Y L, et al. Molecular characterization of three new virulent newcastle disease virus variants isolated in China [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(2): 750-753.
- [13] Kamiya N, Niikura M, Kai C, et al. Protective effect of individual glycoprotein of newcastle disease virus expressed in insect cell; the fusion protein derived from an avirulent strain had lower protective efficacy [J]. *Virus Res*, 1994, 32: 373-379.
- [14] 王 斌, 刘培欣, 李 涛, 等. 抗新城疫病毒 HN 蛋白单链抗体的原核表达及功能鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (5): 383-386.
- Wang B, Liu P X, Li T, et al. Prokaryotic expression and functional analysis of the single-chain antibody against the HN protein of newcastle disease virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(5): 383-386.
- [15] Forsman A, Beirnaert E, Aasa-Chapman M M, et al. Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120 [J]. *J Virol*, 2008, 82(24): 12069-12081.