

DOI:10.13350/j.cjpb.231101

• 论著 •

# 新型冠状病毒重组蛋白疫苗的构建、表达及鉴定\*

张桐<sup>1,2</sup>, 杨松惠<sup>2</sup>, 姜人月<sup>2</sup>, 唐家凤<sup>2</sup>, 许智强<sup>2</sup>, 狄亚心<sup>2</sup>, 于潼<sup>2</sup>, 方效良<sup>3</sup>,

田明尧<sup>2</sup>, 金宁一<sup>2</sup>, 庄忻雨<sup>2\*\*</sup>, 朱光泽<sup>4\*\*\*</sup>

(1. 吉林大学动物医学院, 吉林长春 130062; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 浙江东方生物基因制品有限公司; 4. 长春中医药大学附属医院)

**【摘要】** 目的 利用毕赤酵母系统表达重组新型冠状病毒受体结构域蛋白 RBD, 以期作为新冠病毒重组蛋白候选疫苗。方法 选择新型冠状病毒的 RBD(受体结合域)蛋白为靶点, 通过基因工程技术将 RBD 基因序列克隆到毕赤氏酵母表达载体 pPIC9K 中。通过载体将外源基因整合到毕赤酵母染色体上, 获得遗传性稳定重组子。毕赤氏酵母表达载体含有醇氧化酶基因的调控序列, 加入甲醇进行诱导, 通过前导信号肽引导外源蛋白的分泌表达。结果 成功将 RBD 基因序列克隆到表达载体中并整合到酵母染色体上, 获得遗传性稳定重组子。能通过前导信号肽引导目的蛋白的分泌表达, 表达产物免疫动物刺激产生高水平的血清 IgG 抗体, IgG 抗体效价为  $1:2.73 \times 10^6$ 。结论 重组新型冠状病毒受体结构域蛋白 RBD 的设计具有可行性, 为重组蛋白候选疫苗在预防新型冠状病毒感染中具有潜在的应用价值。

**【关键词】** 新型冠状病毒; 受体结构域蛋白 RBD; 毕赤酵母系统; 重组蛋白候选疫苗

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)11-1241-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov. ;18(11):1241-1244,1251.]

## Construction, expression and identification of recombinant protein vaccine against novel coronavirus

ZHANG Tong<sup>1,2</sup>, YANG Songhui<sup>2</sup>, JIANG Renyue<sup>2</sup>, TANG Jiafeng<sup>2</sup>, XU Zhiqiang<sup>2</sup>, DI Yaxin<sup>2</sup>, YU Tong<sup>2</sup>, FANG Xiaoliang<sup>3</sup>, TIAN Mingyao<sup>2</sup>, JIN Ningyi<sup>2</sup>, ZHUANG Xinyu<sup>2</sup>, ZHU Guangze<sup>4</sup> (1. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China; 2. Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Agricultural Sciences; 3. Zhejiang Dongfang Biological Gene Products Co., Ltd.; 4. Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine)

**【Abstract】** **Objective** The *Pichia pastoris* system was used to express the recombinant 2019-nCoV receptor domain protein RBD to develop a 2019-nCoV recombinant protein candidate vaccine. **Methods** We selected the RBD (receptor binding domain) protein of the new coronavirus as the target, and cloned the RBD gene sequence into the expression vector pPIC9K of *Pichia pastoris* through genetic engineering technology. **Results** The RBD gene sequence was successfully cloned into an expression vector and integrated into the yeast chromosome to obtain genetically stable recombinants. It can guide the secretion and expression of the target protein through the leading signal peptide, and the expression product can stimulate the immunized animals to produce high levels of serum IgG antibodies, and the IgG antibody titer is  $1:2.73 \times 10^6$ . **Conclusion** Antigen design is feasible. The vaccine has potential application value in the prevention of 2019-nCoV infection, and the results of this study provide an effective strategy and method for the development of 2019-nCoV vaccine.

**【Key words】** Novel coronavirus; receptor domain protein RBD; *Pichia pastoris* system; recombinant protein candidate vaccine

\*\*\*新型冠状病毒肺炎, 简称“新冠肺炎”, 世界卫生组织将其命名为“2019 冠状病毒病”(corona virus disease 2019, COVID-19)<sup>[1]</sup>。新冠肺炎疫情肆虐, 严重影响全球经济和公共卫生安全。新型冠状病毒疫苗作为预防和控制新型冠状病毒肺炎最有效、最经济的手段, 其研制备受关注。根据制备技术, COVID-19 疫苗分为灭活疫苗、减毒活疫苗、mRNA 疫苗、DNA 疫苗、病毒载体疫苗、病毒样颗粒疫苗和蛋白质亚单位疫苗<sup>[2-3]</sup>。采用基因工程技术制备蛋白质亚单位疫苗, 如将 COVID-19 的关键抗原 S 蛋白整合重组到酵母菌

或大肠埃希菌等微生物中进行培养, 培养结束后提取表达的 S 蛋白并对其进行收获和提纯, 最终将 S 蛋白制备成疫苗, 注射到机体中刺激机体产生相应抗体<sup>[4]</sup>。

\* **【基金项目】** 新型冠状病毒肺炎变异株重组蛋白疫苗研发项目(No. 21ZGY30)。

\*\* **【通讯作者】** 庄忻雨, E-mail: xinyuzhuang367@163.com  
朱光泽, E-mail: 2894154270@qq.com

**【作者简介】** 张桐(1994-), 男, 甘肃人, 在读博士, 职称, 预防兽医学。E-mail: 347979570@qq.com

当病毒侵入宿主细胞时, S蛋白会被宿主细胞的蛋白酶切割成 S1 亚单位和 S2 亚单位, 这两个亚单位分别承担着受体识别和膜融合的功能<sup>[5]</sup>。S1 亚单位可分为 N 末端结构域(N terminal domain, NTD)和 C 末端结构域(C-terminal domain, CTD)。蛋白晶体结构分析显示, 新型冠状病毒的 CTD 是受体结合域(receptor binding domain, RBD), 主要负责识别宿主细胞表面的特异性受体血管紧张素转换酶 II (angiotensin converting enzyme II, ACE2), 从而介导病毒与宿主细胞之间的相互作用<sup>[6-7]</sup>。故阻断 RBD 与 ACE2 的结合能够阻止新型冠状病毒进入细胞内, 以 RBD 为靶标的特异性抗体或小分子抑制剂是抗新型冠状病毒药物研发的策略之一<sup>[8]</sup>。

酵母是单细胞低等真核生物, 既具有原核生物细胞生长速度快、容易培养、操作简单等优点, 又具有在真核生物表达时对蛋白质的加工和修饰等功能<sup>[9]</sup>。酵母表达系统比其他真核表达系统如昆虫、哺乳动物组织等表达系统快速、简便且成本低<sup>[10]</sup>。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)已成为仅次于大肠埃希菌的常用蛋白表达系统, 广泛应用于实验室规模的蛋白质制备、表征以及结构解析等方面。已经有上千种蛋白在毕赤酵母系统中成功表达<sup>[11]</sup>。毕赤酵母是一种以甲醇为唯一的碳源和能源的甲醇营养型酵母<sup>[12]</sup>。毕赤酵母具有强有力的醇氧化酶基因 AOX 启动子, 是目前最强、调控机制最严格的启动子之一<sup>[13]</sup>。在甲醇为唯一碳源时, 强烈诱导启动子使外源基因大量表达<sup>[14]</sup>。本研究应用毕赤酵母系统表达重组新型冠状病毒受体结构域蛋白 RBD 以开发新冠病毒重组蛋白候选疫苗。

## 材料与方法

### 1 材料

无内毒素质粒大量提取试剂盒, DNA 标志物及蛋白分子质量标准购自天根(北京)公司; 限制酶和 Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA(北京)公司; 重组酶购自诺唯赞(北京)公司; 毕赤酵母 GS115 菌株和表达载体 pPIC9K 购自美国 Invitrogen 公司; 抗体为义翘神州公司生产(货号为 40589-T62); COVID-19 鼠源 IgG 抗体检测试剂盒购自广州市瑞达科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 重组载体的构建** 选取新冠病毒 Delta 株受体结构域 RBD 蛋白基因, 根据毕赤酵母密码子偏好性对其进行优化(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)后由博迈德基因技术有限公司合成并连接在 pPIC9K 载体的 Eco RI 和 Not I 酶切位点之间。

**2.2 表达载体的转化** 从 -80 °C 低温冰箱中取出 *E. coli* TOP10 后迅速置于冰上; 吸取制备的重组质

粒 10 μL 加入到 80 μL *E. coli* TOP10 感受态细胞中, 轻轻混匀后冰浴 20 min, 42 °C 水浴锅中热激约 1 min 30 s, 再置于冰上冰浴 2 min; 加入 300 μL LB 液体培养基, 置于 37 °C 摇床孵育 1 h 左右; 取菌液均匀涂布在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上进行抗性筛选, 平板倒置于 37 °C 培养箱过夜培养后观察。

**2.3 阳性转化子的筛选** 用灭菌牙签从 LB 固体平板上随机挑取单克隆菌落, 将其放入装有 200 μL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基的 EP 管中, 在 37 °C 摇床中培养后通过 5' AOX 和 3' AOX 通用引物(表 1)进行 PCR 筛选, 对 PCR 扩增产物进行 10% 琼脂糖凝胶电泳验证, 验证正确的菌株对应的菌液送测序公司测序。

表 1 PCR 引物  
Table 1 PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
pPIC9K-RBD-F	GCTGAAGCTTACGTAGAATTCATCAC TAACCTTTGTCCATTTCGGTGAGG
pPIC9K-RBD-R	AGGCGAATTAATTCGCGGCCGCTTAA CCTGTACCAGTCAAACCGTTGAAGTTGA
F-5' AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
R-3' AOX1	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC

**2.4 毕赤酵母表达菌株的构建与筛选** 测序验证正确的重组菌经 LB 培养基培养后提取质粒, 然后用 Bgl II 进行酶切线性化, 用 PCR 产物纯化试剂盒收集酶切产物; 将回收的线性化质粒电转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 使目的基因整合到毕赤酵母的基因组上; 电转完成后, 从电转杯中吸出菌液, 加入 1 mol/L 山梨醇 200 μL, 置于 30 °C 培养箱孵育 30~60 min; 取菌液涂布于 MD 板, 置 30 °C 培养箱中培养约 48 h; 从 MD 平板上挑取单菌落, 接种于不同浓度梯度的 YPD (G418) 平板上进行培养; 在含有 1 mg/mL G418 的 YPD 平板上挑取长势良好的菌落, 使用 AOX1 通用引物进行菌落 PCR 验证, 验证正确后接种于 50 mL YPD 培养基进行培养, 待生长至对数期后收集表达菌, 保存于 20% 甘油中。

**2.5 重组毕赤酵母的诱导表达** 将甘油中保存的毕赤酵母表达菌接种于 30 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 震荡培养过夜; 按照 1% 的比例将过夜培养菌接种于 300 mL BMGY 诱导培养基中, 30 °C、200 r/min 震荡培养 72 h, 发酵液于 4 °C 以 10 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 2 min, 取上清进行酶活性检测, SDS-PAGE 电泳检测发酵液上清中 RBD 蛋白的表达情况。

**2.6 RBD 蛋白表达的 Western blot 验证** 回收发酵液上清, 经 SDS-PAGE 电泳(80 V 电泳 30 min, 120 V

电泳直至样品迁移至凝胶底部)后以 15 V 转膜,室温封闭液封闭 2 h,用 PBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入 RBD-T62 4 °C 孵育过夜,同上洗涤;加入山羊抗鼠 IgG-HRP 室温孵育 40 min,洗涤;滴加显影液,使用 GE 公司显影仪显影。

**2.7 动物免疫** 选取 6 只 6 周龄 SPF 级健康的雌性小鼠,随机分成两组,每组 3 只。一组 3 只免疫 RBD (Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG),另一组注射同等体积 PBS 作对照。共免疫 3 次,分别在第 0 d、第 14 d 和第 28 d,均为后肢肌肉注射,5 μg 蛋白/只(蛋白浓度 50 μg/mL),PBS 组免疫体积为 100 μL/只。首次免疫后第 35 d 眼眶静脉采血,分离血清备用。

**2.8 ELISA 检测血清抗体滴度** RBD 蛋白包被量为 0.5 μg/孔,免疫鼠血清作梯度倍比稀释,二抗为 HRP 标记的 Goat anti-mouse IgG 抗体,加入 TMB 显色后用 2 mol/L 硫酸终止反应,用 TECAN 多功能酶标仪读取各孔 A<sub>450</sub> 值。

**2.9 中和抗体测定** 取免疫鼠血清于 56 °C 灭活 30 min,6 000 g 离心 3 min,取上清备用。取 96 孔细胞板,第一列中每孔加入 95 μL DMEM 培养基,第 2 至 12 列中每孔加入 50 μL DMEM 培养基;向第 1 列每孔中加入 5 μL 血清,重悬后吸取 50 μL 转移至第二列,吹打均匀后再吸取 50 μL 转移至第三列,以此类推至第 12 列后弃掉 50 μL 混悬液;每孔加入 50 μL 100 × TCID<sub>50</sub> 的病毒悬液,37 °C 细胞培养箱内孵育 1 h;每孔加入 5 000 个 Vero-E6 细胞,放入 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱培养 5 d,逐日观察 96 孔板中细胞,计算每一列中出现细胞病变 CPE 的孔数。

## 结果

### 1 酵母表达载体的构建及鉴定

将 N 端截短 213 个氨基酸的 RBD 蛋白进行酵母表达系统密码子优化全基因合成,并克隆至 pPIC9K 上酵母表达载体,获得的重组质粒 pPIC9K-RBD,经 PCR 检测 RBD 蛋白基因连入载体(目的片段为 660 bp)。

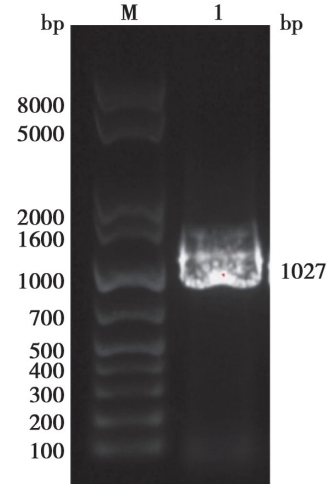
### 2 阳性单克隆菌株的筛选

挑取阳性单克隆菌落,用 5'AOX 通用引物和 3'AOX 通用引物进行菌落 PCR 鉴定(AOX 基因与目的基因合计大小为 1 027 bp),结果与预期相符(图 1)。含有重组质粒的甘油菌交由北京六合华大基因公司测序,经 SnapGene 软件比对分析,测序结果与 RBD 蛋白基因序列相同,无移码现象,表明重组质粒成功转入毕赤酵母菌。

### 3 RBD 蛋白的表达鉴定

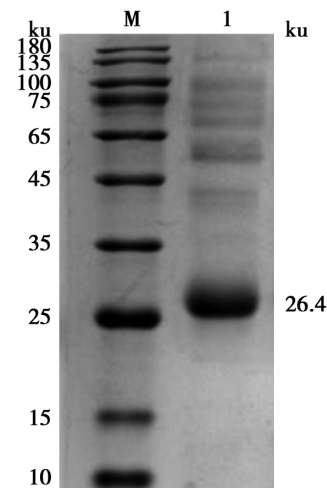
选取验证正确的阳性单克隆菌株进行培养富集,

然后进行甲醇诱导,72 h 后离心,取上清液过膜浓缩。取浓缩液进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 2。表达蛋白分子质量约为 26.4 ku,与 RBD 理论分子质量相符。Western blot 检测显示,重组表达的 RBD 蛋白能被相应抗体识别,反应条带位于 26.4 ku(图 3),表明重组 RBD 具有反应原性。



M DNA 标志物(1 kb plus DNA Ladder) 1 菌落 PCR 产物  
图 1 重组质粒菌落 PCR 产物鉴定

M DNA marker (1 kb plus DNA Ladder) 1 Colony PCR product  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid colony PCR

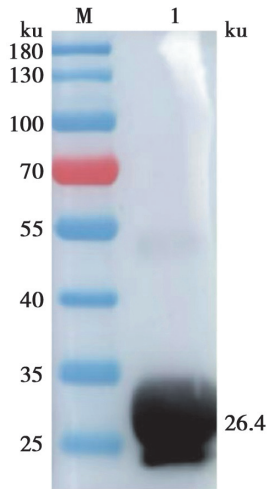


M 蛋白分子质量标准 1 融合蛋白  
图 2 融合 RBD 蛋白的 SDS-PAGE 分析

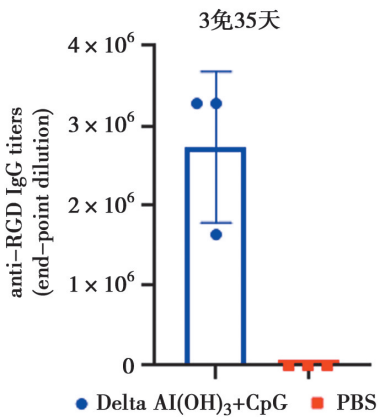
M Protein marker 1 Fusion protein  
Fig. 2 SDS-PAGE results of fusion protein

### 4 RBD 免疫小鼠血清抗体效价

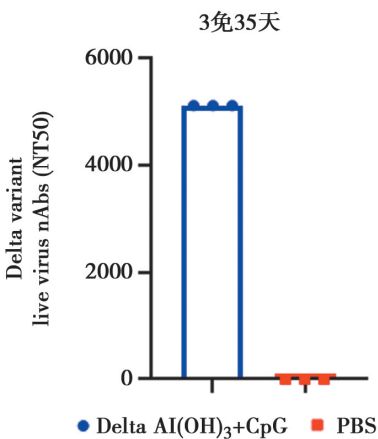
RBD 蛋白免疫小鼠血清 IgG 抗体检测结果显示,首次免疫后第 35d,RBD(Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG)组平均 IgG 抗体效价为 1 : 2.73 × 10<sup>6</sup>,显著高于 PBS 组(图 4);RBD(Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG)组平均中和抗体效价为 1 : 5120,显著高于 PBS 组(图 5)。



M 蛋白分子质量标准 1 融合蛋白与相应抗体反应条带  
图3 融合RBD蛋白的Western blot分析  
M Protein marker 1 Fusion protein  
Fig.3 Western blot analysis of RBD protein



注:蓝色为Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG免疫组,红色为PBS对照组。  
图4 ELISA检测RBD蛋白免疫小鼠血清特异性抗体水平  
Notes:Blue;Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG; Red;PBS。  
Fig.4 ELISA detection of RBD protein-immunized mice serum-specific antibody levels



注:蓝色为Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG免疫组,红色为PBS对照组。  
图5 ELISA检测RBD蛋白免疫小鼠血清中和抗体效价  
Notes:Blue;Delta+Al(OH)<sub>3</sub>+CPG; Red;PBS。  
Fig.5 Detection of neutralizing antibody titer in serum of mice immunized with RBD protein

### 讨论

SARS-CoV-2 是一种新型的  $\beta$  属有包膜的冠状单股正链 RNA 病毒<sup>[15]</sup>, 病毒粒子呈球形。其结构特点大致与其他冠状病毒相同, 有 29 891 个碱基, 编码 9 860 个氨基酸<sup>[16]</sup>。目前爆发的新冠病毒变异株主要特征区域 S 蛋白的 RBD 序列为疫苗设计的核心靶点<sup>[17]</sup>。

毕赤酵母表达系统具有原核生物生长快速、培养基廉价和实验手段简单等特点, 还具备真核生物表达蛋白易于进行加工折叠和翻译后修饰等生物学特性。毕赤酵母具有更强有力的启动子, 分泌效率有所提高, 表达质粒更稳定, 且其胞外分泌产物无过度糖基化, 临床应用安全<sup>[18]</sup>。本实验利用 pPIC9K 载体构建 RBD 毕赤酵母表达体系, 针对毕赤酵母系统特有的醇氧化酶基因(AOX 启动子)为强诱导型启动子, 加入甲醇可诱导外源目的蛋白的高效表达。表达产物存在于液体培养基上清中, 易于纯化。用重组 RBD 蛋白注射免疫小鼠, 可刺激产生高水平的血清抗体。

本研究构建的 RBD 毕赤酵母表达体系可高效表达 RBD 蛋白, 动物免疫试验表明该蛋白具有良好的抗原性, 将有利于发现 RBD 蛋白的拮抗蛋, 为 SARS-CoV-2 病毒的研究、新冠疫苗的研发及其动物实验和免疫效果评价奠定了基础。

#### 【参考文献】

[1] Hasoksuz M, Kilic S, Sarac F. Coronaviruses and SARSCoV-2 [J]. Turk J Med Sci, 2020, 50(SI-1): 549-556.  
[2] Malone B, Urakova N, Snijder EJ, et al. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23: 21-39.  
[3] Ai J, Zhang H, Zhang Q, et al. Recombinant protein subunit vaccine booster following two-dose inactivated vaccines dramatically enhanced anti-RBD responses and neutralizing titers against SARS-CoV-2 and Variants of Concern[J]. Cell Res, 2022, 32: 103-106.  
[4] 张旋旋, 余广彪, 刘晓雅等. 新冠病毒蛋白亚单位疫苗研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2022, 24(05): 434-438.  
[5] Wang Q, Zhang Y, Wu L, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2 [J]. Cell, 2020, 181(4): 894-904.  
[6] Li F, Li W, Farzan M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor [J]. Science, 2005, 309(5742): 1864-1868.  
[7] Hamming I, Timens W, Bultuis MLC, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis [J]. J Pathol, 2004, 203(2): 631-637.

致病中的作用和分子机制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling[J]. J Biol Chem, 2019, 294(6):2109-2120.
- [2] Zhang H, Yang J, Wu S, et al. Glutathionylation of the bacterial Hsp70 chaperone DnaK provides a link between oxidative stress and the heat shock response[J]. J Biol Chem, 2016, 291(13):6967-6981.
- [3] Ghazaei C. Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(3):259-265.
- [4] Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, et al. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori* [J]. Infect Immun, 1998, 66(9):4061-4067.
- [5] Tomoyasu T, Tabata A, Imaki H, et al. Role of *Streptococcus* intermedium DnaK chaperone system in stress tolerance and pathogenicity[J]. Cell Stress Chaperones, 2012, 17(1):41-55.
- [6] Liu N, Sun C, Cui G, et al. The Rab1 in host cells modulates *Brucella* intracellular survival and binds to Brucella DnaK protein[J]. Arch Microbiol, 2016, 198(9):923-931.
- [7] 于瑞. 猪链球菌耐药相关可移动遗传元件的鉴定及其水平传播机制[D]. 郑州:河南农业大学, 2022.
- [8] Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes* [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2015, 91(10):539-559.
- [9] Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2):10.
- [10] Turner CE, Bubba L, Efstratiou A. Pathogenicity factors in group C and G streptococci [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(3).
- [11] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? [J]. Future Microbiol, 2010, 5(3):371-391.
- [12] Pei X, Liu M, Zhou H, et al. Screening for phagocytosis resistance-related genes via a transposon mutant library of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Virulence, 2020, 11(1):825-838.
- [13] Lee JH, Jeon J, Bai F, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* HSP70-like protein DnaK induces IL-1 $\beta$  expression via TLR4-dependent activation of the NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathways [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2019, 67:101373.
- [14] Li Y, Wang J, Liu B, et al. DnaK functions as a moonlighting protein on the surface of *Mycoplasma hyorhinis* cells [J]. Front Microbiol, 2022, 13:842058.
- [15] Candela M, Centanni M, Fiori J, et al. DnaK from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* is a surface-exposed human plasminogen receptor upregulated in response to bile salts [J]. Microbiology (Reading), 2010, 156(Pt 6):1609-1618.
- [16] Sasaki M, Shimoyama Y, Kodama Y, et al. *Abiotrophia defectiva* DnaK promotes fibronectin-mediated adherence to HUVECs and induces a proinflammatory response [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16):8528.
- [17] Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, et al. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Proteomics, 2007, 7(18):3332-3341.
- [18] Knaust A, Weber MV, Hammerschmidt S, et al. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(8):3246-3255.
- [19] Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection [J]. Infect Immun, 2006, 74(7):3693-3706.
- [20] Wang F, Ye B. In silico cloning and B/T cell epitope prediction of triosephosphate isomerase from *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res, 2016, 115(10):3991-3998.
- [21] 陆宝燕, 王宁, 赵鹏鹏, 等. 细粒棘球绦虫 TSP 3 基因的生物信息学分析及原核表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11):1297-1302.
- [22] Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism [J]. Trends Biochem Sci, 2013, 38(10):507-514.
- [23] 张梦姣. 大肠埃希杆菌热休克蛋白 DnaK 和 DnaJ 对细胞周期的影响 [D]. 内蒙古大学, 2017.
- [24] Harrison C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK [J]. Cell Stress Chaperones, 2003, 8(3):218-224.
- [25] Woodbury R, Haldenwang WG. HrcA is a negative regulator of the dnaK and groESL operons of *Streptococcus pyogenes* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(4):722-727.
- [26] 卢良坤. 嗜盐四联球菌 clpB, dnaK, hrcA 基因在耐盐机制中的相互作用 [D]. 华南理工大学, 2013.
- 【收稿日期】 2023-05-24 【修回日期】 2023-08-05
- ~~~~~
- (上接 1244 页)
- [8] Yuan H, Chan Y, Xu FX, et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(9):1141-1149.
- [9] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16(1):23-52.
- [10] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations [J]. Mol Cell Biol, 1985, 5(12):3376-3385.
- [11] Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry [J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(4):1043-1048.
- [12] 罗竞红, 游自立. 巴斯德毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007(03):75-79.
- [13] Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris* [J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(3):1316-1323.
- [14] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. YEAST, 2005, 22(4):249-270.
- [15] Wrapp D, Wang N, Corbett KK, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. Science (New York, N. Y.), 2020, 367(6483):1260-1263.
- [16] Cui J, Li F, Shi ZL, et al. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17:181-192.
- [17] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full length human ACE2 [J]. Science, 2020, 367(6485):eabb2762.
- [18] Byrne B, Kim H, Yoo SJ, et al. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins [J]. Curr Opin Struct Biol, 2015, 32(1):9-17.
- 【收稿日期】 2023-05-31 【修回日期】 2023-08-14