

表达新型冠状病毒 S 蛋白的口服重组酵母及其制备与应用

技术领域

本发明属于生物基因工程技术领域，涉及一种表达新型冠状病毒 S 蛋白的口服重组酵母及其应用。

背景技术

新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19) 是由新型冠状病毒 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染导致的急性呼吸系统传染病。

SARS-CoV-2 为单股正链 RNA 病毒，分类地位为巢病毒目 (*Nidovirales*) 冠状病毒科 (*Coronaviridae*) 正冠状病毒亚科 (*Orthocoronavirinae*)。与 SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)、MERS (Middle East Respiratory Syndrome) 同属于 beta 类冠状病毒。基因组 29,903 bp，编码主要的结构蛋白包括刺突蛋白(Spike glycoprotein, S)、囊膜蛋白(Envelop, E)、核衣壳蛋白(nucleocapsid phosphoprotein N)、膜蛋白(membrane glycoprotein, M)等。在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 中刺突蛋白 S 通过不同的受体结合结构域(receptor-binding domains, RBDs)与宿主细胞结合。MERS-CoV 的 S 蛋白与宿主细胞二肽基肽酶IV(dipeptidyl peptidase 4, DPP-4,also known as CD26)结合^[1]，而 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 一致，细胞表面的血管紧张素转化酶 2 (Angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是 S 蛋白 RBD 的结合位点^[2,3]。有研究表明 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 的 RBD 区域存在差别，主要存在于 C 端 318-507 aa^[4]，二者不具有完全的保护性，因而需要研发特异性的抗新型冠状病毒保护制剂。

比较成熟的异源蛋白表达系统包括酵母细胞、原核表达系统和杆状病毒昆虫细胞表达系统。相较于后两者，酵母细胞兼具成熟的翻译后修饰能力和培养周期短、安全、便捷、生产成本低等优势^[5]。利用酵母表面展示技术(Yeast surface display, YSD)将外源蛋白展示于酵母细胞表面，可制备口服型保护制剂。同时酵母细胞壁多糖对机体的免疫系统具有调节作用，可抗病毒、增强免疫功能，促进免疫器官发育，因而酵母口服制剂的开发具有良好的应用前景。

发明内容

本发明的目的之一在于提供一种新型冠状病毒刺突蛋白 S 表面展示型重组酵母及其

应用，具体将其用于口服制剂的研制。

本发明的目的之二在于提供所述口服重组酵母的制备方法。

本发明的目的之三在于提供所述口服重组酵母的用途。

本发明目的是通过如下技术方案实现的：

- 5 一种表达新型冠状病毒 S 蛋白的重组酵母，ST1814G-S(RBD-FP)，其包含 S 蛋白的 16 位至 1035 位氨基酸。

一种新型冠状病毒 S 蛋白的截短体，优选为第 300 至 1000 位氨基酸，序列特征为 SEQ ID No.1，为包含第 330 位至 521 的 RBD 结构域和第 816 至 833 位 FP 融合肽。

- 10 表达所述蛋白截短体的基因，包含刺突蛋白 S 的 RBD 结构域，即从第 991 位至 1563 位碱基和 FP 结构域，即从第 2449 位至 2499 位碱基，其核苷酸序列为 SEQ ID No.2。

构建所述重组酵母的质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU，序列特征为 SEQ ID No.3，由权利要求 3 所述基因片段和 POT-GPD-TU 载体组成。

- 15 制备新型冠状病毒 S 蛋白重组酵母的方法，将体外构建的 S 蛋白截短体完整转录单位 GPD-S(RBD-FP)-TU，通过同源重组整合于酵母基因组，利用 Aga1-Aga2 表面展示系统将 S 蛋白展示于酵母细胞表面，获得 S 蛋白表面展示型的重组酵母菌株 ST1814G-S(RBD-FP)，并利用所得菌株制备口服重组酵母。

具体包括以下步骤：

- 20 (1) SARS-CoV-2 刺突蛋白 S 编码基因的 PCR 扩增：参考 SARS-CoV-2 病毒基因序列 NC_045512.2，合成 S 基因，序列特征为 SEQ No.2；以 pcDNA3.1-CoV-S 质粒为模板，设计引物扩增 S 蛋白编码基因 S(RBD-FP)用于酵母载体连接；

(2) Aga2 基因与 SARS-CoV-2 刺突蛋白 S 编码序列 S(RBD-FP)串联：通过 BamHI 单酶切线性化 POT-GPD-TU 载体，无缝克隆连接 S 基因片段至表面展示表达载体 GPD-POT-TU 上，获得重组质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU，其序列特征为 SEQ No.3。重组质粒转化至 *E.coli* DH5a 中，用 S 基因检测引物进行 PCR 及测序验证，获得阳性克隆；

- 25 (3) S 蛋白酵母重组菌株的构建：将重组质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU 与同源臂 URRs、筛选标签 Leu 编码序列进行酶切拼接，获得完整的包含 S 基因序列的重组基因，转化到酿酒酵母基因组，经营养缺陷型平板筛选后获得重组菌株，利用检测引物进行基因水平检测，Western blot、免疫荧光进行蛋白表达水平验证。

新型冠状病毒 S 蛋白的重组酵母在制备用于抗新型冠状病毒药物中的应用。

本发明有益效果：本发明基于新型冠状病毒与宿主细胞 ACE2 受体结合时触发侵染启动的刺突蛋白 S，制成了包含受体结合域及与病毒致病相关 FP 结构域的 S 蛋白截短体表面展示型口服重组酵母制剂。通过口服途径激发机体保护性免疫反应，并借助酵母细胞壁多糖对机体先天性免疫系统的调节作用，发挥更加有效的免疫保护。与新型的腺病毒疫苗、mRNA 疫苗相比，口服重组酵母制剂成本低、可实现大规模放大生产，安全可靠，具有良好的应用开发前景，为新型冠状病毒的免疫防控提供选择。

本发明中所述的新型冠状病毒 S 蛋白口服重组酵母制剂在国内属于首次报道，表面展示菌株构建及制剂制备具有一定的创新性，为 COVID-19 的防控提供新思路与制剂。

10 附图说明

图 1：新型冠状病毒 S 蛋白编码基因结构模式图；

图 2：S(RBD-FP)基因 PCR 扩增结果；

图 3：GPD-S(RBD-FP)-TU 质粒转化大肠杆菌后的转化子检测；1-10 泳道分别代表不同的大肠杆菌转化子菌落 PCR 检测结果，CK+是以 S(RBD-FP)基因 PCR 产物为模板的扩增，

15 CK-为 ddH₂O 对照；

图 4：GPD-S(RBD-FP)-TU 完整转录单位拼接模式图；

图 5：GPD-S(RBD-FP)-TU 完成酵母转化后在 SD-leu 培养基中的生长情况；

图 6：ST1814G- S(RBD-FP)重组酵母的基因型验证；分别对应大肠杆菌的 2 号和 3 号转化子进行酵母转化后验证基因型。泳道 1-6 分别为 6 个不同的酵母转化子，CK+为质粒

20 GPD-S(RBD-FP)-TU 为模板的 PCR 扩增，CK-为 ddH₂O 为模板的阴性对照；

图 7：ST1814G- S(RBD-FP)酵母菌株的 Western blot 验证，S 蛋白截短体经 His 抗体检测后出现两条带。分子量大的为糖基化修饰的 S 蛋白截短体，分子量小的为蛋白酶切后产物；泳道 3-1，3-4 和 3-6 对应 3 株不同的酵母转化子；

图 8：ST1814G-S(RBD-FP)重组酵母中 S(RBD-FP)蛋白的免疫荧光观察；以 ST1814G 空菌株为对照；

图 9：ST1814G-S(RBD-FP)重组酵母的生长曲线及其与蛋白表达趋势的关系；a 为菌体的生长曲线，以 ST1814G 为对照，表达蛋白的菌株生长趋势与对照组一致；b 为不同培养时间点的蛋白表达情况分析，泳道 1-5 分别代表培养 1d 至培养 5d；

图 10：BALB/c 小鼠口服重组酵母后血清中特异性 IgA 和 IgG 的检测；A：ELISA 检测未口服组(Blank)、口服原始空白酵母(Host)与口服重组酵母(FP)后血清中 IgG 的情况；B：

ELISA 检测未口服组(Blank)、口服原始空白酵母(Host)与口服重组酵母(FP)后血清中 IgA 的情况。

具体实施方式

以下结合实例进一步阐述本发明，其中的内容不应理解为限定该发明的范围。实施例 5 中所述试剂除特别说明，均为商业化试剂。

实施例 1. GPD-*S(RBD-FP)*-TU 载体的构建

(1) *S(RBD-FP)*基因的扩增

S 蛋白编码基因由 S1 亚基和 S2 亚基两部分组成。其中 S1 亚基包含 RBD 结构域，可结合宿主细胞 ACE2 受体的 PD 域(peptidase domain); S2 亚基含有融合肽 FP (hydrophobic fusion peptide)序列，帮助病毒与宿主细胞膜靠近并发生融合，类似的结构在 SARS-CoV 10 中同样存在^[8,9]。根据 S 基因序列结构(图 1 所示)，设计并合成引物，CoV-S-F (SEQ ID NO.4:GACGATAAGGTACCAGGATCCATGAAGTGTACGTTGAAATCCT)和 CoV-S-R (SEQ ID NO.5:gaattccaccacactggatccTCTGCCTGTGATCAACCTAT)，根据已有报道的病毒基因组序列(Genbank 号 MT407658.1)，人工合成了 S 蛋白的基因片段，并构建了 15 pcDNA3.1-CoV-S 质粒，以该质粒为模板，扩增包含 RBD 和 FP 区域的 S 蛋白编码基因 *S(RBD-FP)*。PCR 扩增体系为：

	模板 DNA	1μL
	CoV-S-F (10μM)	1μL
	CoV-S-R (10μM)	1μL
20	2*Hieff Mix (YEASEN)	12.5μL
	ddH ₂ O	To 25μL

使用以下 PCR 程序进行扩增：

	98°C	5 min	
	95°C	10 s	} 30 cycles
25	56°C	10 s	
	72°C	2 min	
	72°C	5 mins	

PCR 产物大小为 2106 bp。

PCR 结果如图 2 所示，最右侧泳道为 *S(RBD-FP)*基因的扩增结果。

(2) GPD-*S(RBD-FP)*-TU 载体的构建

将 *S(RBD-FP)* 基因连接到实验室已构建的 POT-GPD-TU 载体上^[7]。POT-GPD-TU 载体经 *Bam*HI 酶切线性化后与 *S(RBD-FP)* 基因连接, *S(RBD-FP)* 基因 N 端与 Aga2 连接并串联融合表达, 基因 C 端带有载体上的 His 标签。利用无缝克隆试剂盒(C112-01, Vazyme)获得连接产物, 并转化 *E.coli* DH5 α 。大肠杆菌转化子经 Amp 抗性平板筛选, 并用 S 基因检测引物(S-F 331: aatattacaaactgtgtgccct (SEQ ID NO.6) 和 S-R 524: aacagttgctggtgcatgtag (SEQ ID NO.7)) 进行 PCR 验证及测序。

结果如图 3 所示, PCR 扩增产物大小为 579 bp, 阳性转化子为 No.1-8 和 9 号, 选择其中 2 号和 3 号测序, 与预期结果一致, 表明 GPD-*S(RBD-FP)*-TU 质粒构建成功。

实施例 2. 新型冠状病毒酵母重组菌株 ST1814G-*S(RBD-FP)* 的构建及检测

(1) 酵母转化片段的构建

用 *Bsa*I 酶切载体 GPD-*S(RBD-FP)*-TU, 同时, *Bsm*B I 酶切同源臂质粒(URR1 和 URR2) 和选择性标记质粒 (LEU)。参照 Dai 课题组的实验步骤^[6], 将 URRs 同源臂、LEU 选择性标签、GPD-*S(RBD-FP)*-TU 转录单位, 按照特异性前后缀序列进行拼接, T4 连接酶 16°C 过夜连接, 拼接产物 (如图 4) 用于酵母转化。

(2) ST1814G- *S(RBD-FP)* 重组酿酒酵母菌株的构建

①菌株活化: 挑取 ST1814G 单菌落接种到 3 mL YPD 液体培养基中, 30°C、220 rpm 过夜培养。将过夜培养的菌液按 1: 50 的比例转接到 5 mL 新鲜的 YPD 培养基中, 使其初始 OD 为 0.1~0.2, 30°C、220 rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8。2500 rpm 离心 5 min 收集 5 mL 菌液的菌体, 并用 1 mL 无菌水洗涤细胞, 弃去上清。

②酵母转化: 向离心后的菌体沉淀中加入 100 μ L 0.1M 的醋酸锂, 重悬细胞, 12000 rpm 离心 20 s 弃去上清。加入 50 μ L 0.1M 醋酸锂, 重悬细胞, 12000 rpm 离心 20s 收集菌体。然后在离心管中依次加入 240 μ L 50 % 的 PEG4000、36 μ L 1M 醋酸锂、100 μ g 鲑鱼精 DNA、2 μ g 片段 DNA, 剧烈震荡至完全混匀。30°C 200 rpm 30 min, 42°C 25 min, 6000 rpm 离心 15 s 收集菌体, 去除转化液, 加入 1mL 的 YPD 液体培养基于 30°C 孵育 2 h, 2500 rpm 离心 5 min 收集菌体, 用 50 μ L 去离子水重悬细胞, 尽可能温和的吹吸混匀, 将菌体涂布在 SD-leu 固体培养基表面, 30°C 培养箱生长 2~3 天, 直至形成典型菌落。挑取单菌落在 SD-leu 平板划线纯化, 同步接种至 3 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、220 rpm 过夜培养,

用于基因型验证。

③ST1814G- S(RBD-FP)菌株的基因型验证

选择在 SD-leu 培养基中生长的酵母，提取其基因组 PCR 验证 *S(RBD-FP)* 基因是否成功整合到基因组。酵母基因组的提取方法参照文献进行^[10]。取 100 μ L 培养后的菌液 6000 rpm 离心 1 min 弃去上清，用 100 μ L 裂解液(200mM LiOAc, 1% SDS)重悬细胞，70°C 孵育 5 min. 加入 300 μ L 无水乙醇混匀，于 15000 g 离心 3 min 收集细胞碎片。70%乙醇清洗后加入 50-100 μ L ddH₂O 重悬沉淀。15000 g 离心 15s 后吸取上清作为基因组模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系如下：

	基因组 DNA	1 μ L
10	S-F 331 (10 μ M)	1 μ L
	S-R 524 (10 μ M)	1 μ L
	2* Mix Buffer (P111-01, Vazyme)	10 μ L
	ddH ₂ O	To 20 μ L

使用以下 PCR 程序进行扩增：

15	95°C	5 min	
	95°C	15 s	} 30 cycles
	56°C	15 s	
	72°C	30 s	
	72°C	5 mins	

20 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，同时以质粒 GPD-*S(RBD-FP)*-TU 为阳性对照，ddH₂O 为阴性对照。

实验结果如图 5 所示，质粒 GPD-*S(RBD-FP)*-TU 的 2 号和 3 号大肠杆菌转化子经酶切、连接后转化酵母细胞，虽二者均可在 SD-leu 的选择性培养基生长，但仅 3 号质粒可获得基因型正确的重组酵母菌株 ST1814G- S(RBD-FP)。正确的重组酵母编号为 No.1, No.4 和 No.6 (图 6)。

④ST1814G- S(RBD-FP)菌株的表型验证

由于 GPD-*S(RBD-FP)*-TU 载体插入片段 S(RBD-FP)的 C 端带有 His 标签，利用 Western blot 抗 His 抗体检测目的基因 *S(RBD-FP)* 的表达情况，利用激光共聚焦显微镜观察蛋白展示情况。

Western Blot:

收集 2 mL 48 h 的 YPD 培养液, 6000 rpm 离心 1 min 收集菌体, 加入酸洗玻璃珠, 60 μ L PEB 缓冲液重悬菌体, 玻璃珠法破壁 5 次, 加入 15 μ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 4 $^{\circ}$ C 下 12000 rpm 离心 10 min, 小心吸取上清, 8 μ L 上清用于 12% SDS-PAGE 电泳。

- 5 SDS-PAGE 电泳结束后, 通过湿转法将蛋白分离胶转移至与其同等大小的 PVDF 膜上, 转膜条件为 300 mA 100 min; 转膜完成后, 在室温下, 用 5 % 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h; 将膜完全浸没在用 5 % BSA 1:2000 稀释的鼠抗 His 单克隆抗体(HT501, Transgene) 中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 回收一抗, 用 TBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min; 用 5 % BSA 1:5000 稀释的羊抗鼠 HRP 标记二抗 (LK2003, Sungene Biotech) 室温孵育 1 h; TBST
- 10 缓冲液漂洗 PVDF 膜 3 次; 避光向 PVDF 膜正面滴加化学发光显色底物(34075, ThermoFisher), 通过 Bio-rad 化学发光成像仪曝光, 观察蛋白表达情况。

免疫荧光:

- 收取 500 μ L 诱导 48 h 的 ST1814G- S(RBD-FP)菌液, 4000 rpm, 离心 5 min 收集菌体; 取诱导 48 h 后的 ST1814G 作为阴性对照; 用 500 μ L PBST 洗涤菌体 3 次, 4000 rpm, 5 min,
- 15 弃上清; 分别用 200 μ L PBST 1:2000 稀释的 6*His-Tag 抗体重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C 旋转结合 1 h; 回收一抗; 500 μ L PBST 洗涤菌体 3 次, 同上离心弃上清; 加入 200 μ L PBST 1:5000 稀释的 FITC-标记的羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 回收二抗; 500 μ L PBST 洗涤菌体 3 次, 同上离心弃上清; 用 50 μ L PBS 重悬菌体, 取 10 μ L 菌液滴于干净的载玻片上, 盖上盖玻片, 四周涂上指甲油固定盖玻片, 在激光共聚焦显微镜下观察。

- 20 结果如图 7 所示, 重组酵母菌株 No.1, No.4 和 No.6 均可表达 S 蛋白。S 蛋白分子量理论值为 78 KDa, 但实际观测结果为 135 KDa 和 23 KDa 两条带。S 蛋白有多个糖基化位点, 分子量增加考虑糖基化所致。分子量变小推测被蛋白酶切割所致。免疫荧光结果如图 8 所示, 对照组 ST1814G 未出现荧光(图 8 上); 而实验组 ST1814G- S(RBD-FP)则有明显绿色荧光出现(图 8 下), 说明 S 蛋白成功表达且定位在重组酿酒酵母细胞表面。

- 25 ⑤ST1814G-S(RBD-FP)菌株的生长及蛋白表达规律

取 ST1814G-S(RBD-FP)菌株 4 号转化子单菌落, 接种于 20 mL YPD 液体培养基中, 间隔 24 h 取样 2 mL 进行 OD₆₀₀ 测定, 并以最初时间点菌量最低值为标准, 调整菌体量一致, 制备不同时间点的蛋白样品, 进行 Western blot 检测。

结果如图 9 所示, 从 9-a 图生长曲线分析, S(RBD-FP)蛋白截短体的表达对菌体的生

长没有影响，菌体生长趋势与对照组一致，随培养时间的延长菌体量逐渐增加。同时，蛋白的表达量也随培养时间的延长而增加，培养 5 d 时表达量最高(图 9-b)。

实施例 3. 新型冠状病毒 S 蛋白重组酵母的制备

以 ST1814G- S(RBD-FP) No.4 号菌株为种子，取单菌落接种 20 mL YPD 液体培养基，
5 30 °C 培养过夜，再取过夜培养的种子液以 1:100 稀释接种至新鲜的 1L YPD 液体培养基中，
培养 3-4 d 后离心收集菌体，PBS 清洗一次，经抽真空冷冻干燥后制得重组菌株干粉。

实施例 4. 新型冠状病毒 S 蛋白酵母重组菌株的应用

SPF 级 BALB/c 小鼠分为三组，每组 6 只，分别于第 1、6、11 和 23 天喂饲
ST1814G-S(RBD-FP) No.4 酵母菌株， 10^7 cfu/只小鼠，以 ST1814G 空白酵母菌株为对照。
10 第四次免疫后，眼球采血检测 IgG 和 IgA 抗体水平。

应用试验设计原核表达 SARS-COV2 S 蛋白 RBD 结构域，获得纯化蛋白，抗体制备，
应用纯化的 RBD 蛋白，羊抗小鼠 IgG、IgA-HRP 酶结合物，间接 ELISA 检测 IgG 和 IgA
水平。

结果如图 10 所示，喂食 ST1814G-S(RBD-FP) No.4 重组酵母组的血清中 S 蛋白特异
15 性的 IgG (图 10A) 和 IgA (图 10B) 的水平明显升高，表明重组酿酒酵母菌株可以很好的
激发机体的体液免疫和粘膜免疫，可作为新型免疫防护制剂，为新型冠状病毒防控提供
选择。

尽管本发明内容是结合上述实施例进行说明，但本发明的实施方式并不受上述实施例
20 的限制，本发明的范围由所附权利要求书限定，其他的任何在限定范围内所作的改变或修
饰，均应为等效的置换方式，均包含在本发明的保护范围之内。

References:

- [1]. Meyerholz, D.K., A.M. Lambertz and P.B. McCray, Dipeptidyl Peptidase 4 Distribution in the Human
25 Respiratory Tract. The American Journal of Pathology [J]. 2016. 186(1): p. 78-86.
- [2]. Zhou, P., et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. Nature,
2020.
- [3]. Ge, X., et al., Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor [J].
Nature, 2013. 503(7477): p. 535-538.

- [4]. Tian, X., et al., Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020. 9(1): p. 382-385.
- [5]. Chen, W. and G. Georgiou, Cell - Surface display of heterologous proteins: From high - throughput screening to environmental applications [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002. 79(5): p. 496-503.
- 5 [6]. Guo, Y., et al., YeastFab: the design and construction of standard biological parts for metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015. 43(13): p. e88-e88
- [7]. 黄金海. 一种制备非洲猪瘟病毒P30、P54酵母疫苗的方法[P]. 中国专利: 201911286530.6, 2019-12-13
- [8]. Yan, R., et al., Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* (New York, N.Y.), 2020: p. eabb2762.
- 10 [9]. Song, W., et al., Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLOS Pathogens*, 2018. 14(8): p. e1007236.
- [10]. Locke, M., et al., Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 2011. 50(5): p. 325-328.

权利要求

1. 一种表达新型冠状病毒 S 蛋白的重组酵母, ST1814G-S(RBD-FP), 其包含 S 蛋白的 16 位至 1035 位氨基酸。
- 5 2. 一种新型冠状病毒 S 蛋白的截断体, 优选为第 300 至 1000 位氨基酸, 序列特征为 SEQ ID No.1, 为包含第 330 位至 521 的 RBD 结构域和第 816 至 833 位 FP 融合肽。
3. 表达权利要求 2 所述蛋白截断体的基因, 其特征在于, 包含刺突蛋白 S 的 RBD 结构域, 即从第 991 位至 1563 位碱基和 FP 结构域, 即从第 2449 位至 2499 位碱基, 其核苷酸序列为 SEQ ID No.2。
- 10 4. 构建权利要求 1 所述重组酵母的质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU, 序列特征为 SEQ ID No.3, 由权利要求 3 所述基因片段和 POT-GPD-TU 载体组成。
5. 制备新型冠状病毒 S 蛋白重组酵母的方法, 其特征在于, 将体外构建的 S 蛋白截断体完整转录单位 GPD-S(RBD-FP)-TU, 通过同源重组整合于酵母基因组, 利用 Aga1-Aga2 表面展示系统将 S 蛋白展示于酵母细胞表面, 获得 S 蛋白表面展示型的重组酵母菌株 ST1814G- S(RBD-FP), 并利用所得菌株制备口服重组酵母。
- 15 6. 根据权利要求 5 所述制备新型冠状病毒 S 蛋白重组酵母的方法, 其特征在于, 具体包括以下步骤:
 - (1) SARS-CoV-2 刺突蛋白 S 编码基因的 PCR 扩增: 参考 SARS-CoV-2 病毒基因序列 NC_045512.2, 合成 S 基因, 序列特征为 SEQ No.2; 以 pcDNA3.1-CoV-S 质粒为模
 - 20 板, 设计引物扩增 S 蛋白编码基因 S(RBD-FP)用于酵母载体连接;
 - (2) Aga2 基因与 SARS-CoV-2 刺突蛋白 S 编码序列 S(RBD-FP)串联: 通过 *Bam*HI 单酶切线性化 POT-GPD-TU 载体, 无缝克隆连接 S 基因片段至表面展示表达载体 GPD-POT-TU 上, 获得重组质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU, 其序列特征为 SEQ No.3. 重组质粒转化至 *E.coli* DH5a 中, 用 S 基因检测引物进行 PCR 及测序验证, 获得阳性
 - 25 克隆;
 - (3) S 蛋白酵母重组菌株的构建: 将重组质粒 GPD-S(RBD-FP)-TU 与同源臂 URRs、筛选标签 Leu 编码序列进行酶切拼接, 获得完整的包含 S 基因序列的重组基因, 转化到酿酒酵母基因组, 经营养缺陷型平板筛选后获得重组菌株, 利用检测引物进行基因水平检测, Western blot、免疫荧光进行蛋白表达水平验证。
- 30 7. 新型冠状病毒 S 蛋白的重组酵母在制备用于抗新型冠状病毒药物中的应用。