

SARS 冠状病毒 M 基因在大肠杆菌中的表达及其免疫学特性初步研究

晏辉钧¹, 赵卫², 方丹云¹, 周经姣¹, 龙北国², 张文炳², 郭辉玉¹, 江丽芳¹

(1.中山大学基础医学院微生物学教研室, 广东 广州 510080; 2.南方医科大学微生物学教研室, 广东 广州 510515)

摘要:【目的】在大肠杆菌中表达 SARS 冠状病毒包膜(M)蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合蛋白,并对其进行血清学鉴定。【方法】克隆编码 SARS 冠状病毒 M 蛋白的基因,并在原核系统中表达 GST-M 融合蛋白,用 Western blot 和酶联免疫吸附试验(ELISA)分析 GST-M 融合蛋白。【结果】10 份 SARS 患者恢复期血清均能识别 M-GST 融合蛋白,并在 $M_r = 52\ 000$ 附近出现特异性结合带;而 10 份正常人血清不与 M-GST 融合蛋白起反应。【结论】本研究获得了 SARS 冠状病毒 GST-M 融合蛋白,它可与 SARS 患者的恢复期血清产生特异性的结合反应,为研究 SARS 冠状病毒感染宿主细胞的过程和制备重组疫苗提供了条件。

关键词:SARS 冠状病毒; 包膜蛋白; 基因表达; 抗体

中图分类号:R373.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)01-0038-04

Expression of SARS Coronavirus M Gene in *E.Coli* and Its Immunological Characteristics

YAN Hui-jun¹, ZHAO Wei², FANG Dan-yun¹, ZHOU Jing-jiao¹, LONG Bei-guo², ZHANG Wen-bing², GUO Hui-yu¹, JIANG Li-fang¹

(1. Department of Microbiology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Microbiology, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To express membrane protein (M) of SARS coronavirus (SARS-CoV) fused with glutathione S-transferase (GST) and then detect its reactivity in the sera from convalescent SARS patients.

Methods The GST-M fusion protein was expressed in *E.Coli*, and then detected by Western blot and ELISA with 10 serum samples of convalescent SARS patients and 10 serum samples of healthy donors. **Results** According to the SDS-PAGE and ELISA analysis, the relative molecular mass (M_r) of the GST-M fusion protein is about 52 000. The fusion protein could react with all the sera from convalescent SARS patients, but not with the sera from healthy donors. **Conclusion** The GST-M fusion protein provides a basis for the research on its role in the course of SARS coronavirus infection of host cells and preparation of recombinant vaccine against SARS coronavirus.

Key words: SARS-CoV; membrane (M) protein; gene expression; antibody

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005,25(1):38-41]

传染性非典型肺炎也称严重急性呼吸综合征(SARS),该病传播迅速,发病凶险^[1],是一种由

SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 引起的新型传染病^[2,3]。在 2002 - 2003 年度的流行事件中,共造成全

收稿日期:2004-09-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30340013);广东省科技攻关基金资助项目(532014202028)

作者简介:晏辉钧(1968-),男,湖南临湘人,在职博士生,讲师;江丽芳,教授,博士生导师,通讯作者,课题负责人. E-mail:jianglf

909@ yahoo.com.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

球 8 422 人发病,916 人死亡。SARS-CoV 的核酸为单股正链 RNA,2003 年 4 月 12 日加拿大科学家^[4]首先完成其全基因组序列测定(GeneBank 中 AY274119,即 TOR2 株),长度为 29 751 bp。同源性分析表明,SARS-CoV 基因组结构虽与其他冠状病毒相似,却不属于已定义的冠状病毒基因组和血清学分类。Ksiazek 等^[5]推测 SARS-CoV 的主要蛋白质有 RNA 复制酶(复制酶 1a,1b)、S 蛋白(spike protein)、M 蛋白(membrane protein)、E 蛋白(small membrane protein)、N 蛋白(nucleocapsid protein),并包括 9 个潜在的阅读框架。其中,基因组 26 398~27 063 位编码一长 221 氨基酸的膜蛋白(简称 M 蛋白)。M 蛋白是一种跨膜蛋白,在病毒装配、成熟和释放中起重要作用,同时 M 蛋白具有一定的免疫原性^[4,5]。SARS-CoV GD322 株为本实验室分离株,本研究拟扩增其全长 M 基因片段,在大肠杆菌表达系统中表达,利用 SARS 恢复期患者抗体阳性血清鉴定该重组蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清来源 SARS 恢复者血清(广州市疾病预防控制中心采集)来自 SARS 痊愈 1 个月后的临床诊断确诊为 SARS 的患者,血清经 SARS-CoV 全病毒蛋白 ELISA 检测抗 SARS 抗体阳性。正常人血清为本室从没有 SARS 流行的地区收集的健康人血清,且均不含抗 GST 蛋白抗体。

1.1.2 菌种、质粒和试剂 大肠杆菌菌种 BL21(DE3)和表达质粒 pET-42(a)购自 Novagen 公司,并由本室保存。Vero-E6 细胞为本室保存。SARS 冠状病毒(GD322 株)^[6]为本室分离培养。提取病毒 RNA 试剂盒用 Omega Bio-tek 的 E.Z.N.A Hp Viral RNA Kit,AMV 逆转录酶、RNasin、T4 DNA 连接酶、内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 均为 Promega 产品,卡那霉素、*Taq* 聚合酶和 dNTP 购自北京鼎国生物工程有限公司,质粒小量提取试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒均购自上海生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物 引物由上海博亚生物工程有限公司合成。上游引物:5'-CggtaccATGGCA GACA ACGGTAC-3',内切酶 *Kpn* I 序列,对应于 TOR2

株 26 398~26 414 nt;下游引物:5'-Gctcgag CTATTACTGTACTAGCAAAG-3',内切酶 *Xho* I 序列,互补于 TOR2 株 27 066~27 047 nt。扩增片段长度(包括内切酶位点)共 681 bp。

1.2.2 标本处理及 RNA 的提取 SARS-CoV (GD322)感染 Vero-E6,待 CPE 达到++~+++时,收集病毒培养上清,使用 Omega Bio-tek 的 E.Z.N. A Hp Viral RNA Kit 提取 RNA。

1.2.3 RT-PCR 使用 Eppendorf 的 Autorisierter Thermocycler,进行 RT-PCR。按常规逆转录法得到 cDNA,其反应条件为:37 °C,60 min;95 °C,3 min。PCR 采用热启动法,即将 cDNA 94 °C 变性 5 min 后再加入 *Taq* 聚合酶。PCR 条件为:94 °C,30 s;60 °C,30 s(drop 1 °C/cycle);72 °C,1 min。共 10 次循环。94 °C,30 s;55 °C,30 s;72 °C,1 min。共 25 次循环。72 °C,7 min。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.4 PCR 产物的克隆测序 质粒酶切、连接、转化等技术均参考《分子克隆实验指南》进行,*Kpn* I / *Xho* I 双酶切 PCR 产物与 pET-42(a),分别回收纯化,连接产物转化至大肠杆菌 BL21(DE3),用饱和酚快速提取质粒初筛,并对获得的阳性克隆进行 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切初步鉴定、PCR 鉴定和序列测定。

1.2.5 初步诱导表达 挑取阳性克隆单菌落,接种至 3 mL LBK (含 30 μg/mL 卡那霉素)中,37 °C (250 r/min) 振摇过夜,取 1 mL 上述菌液至 100 LBK 中,37 °C (250 r/min) 振荡培养 3 h,待吸光度 A_{600} 达到 0.5~0.7 之间,加入 IPTG 诱导表达(终浓度 1 mmol/L),28 °C 继续剧烈振荡培养,12 h 内每隔 1 h 收集 1 mL 菌液,-80 °C 保存其上清及沉淀,24 h 收集全部上清及沉淀,取上清进行 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶,8%分离胶),考马斯亮蓝染色观察蛋白质带,确定表达蛋白的相对分子质量,并用蛋白薄层扫描测定表达蛋白含量。

1.2.6 免疫印迹 将 SDS-PAGE 凝胶转印 NC 膜,封闭洗涤后加入 SARS 患者恢复期血清,孵育洗涤后按常规方法加入山羊抗人酶标二抗与底物进行显色反应。

1.2.7 酶联免疫吸附试验(ELISA) 紫外分光光度计测定表达蛋白的 A_{260} 和 A_{280} ,估计其含量,用 0.05 mol/L PH 9.5 碳酸盐缓冲液(包被液)稀释蛋白至终质量浓度 0.40 mg/mL,微孔板每孔加入

200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。甩弃液体, 每孔加入封闭液(含体积分数 10 % 小牛血清的包被液) 200 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min, 用洗液洗涤 4 次, 拍干。每孔加入 1:10 稀释的待测血清 100 μL (稀释液为含体积分数 5 % 小牛血清的体积分数 0.02 % 吐温 PBS), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min, 用洗液洗涤 4 次, 拍干。每孔再加入 1:200 稀释辣根过氧化物酶标山羊抗人 IgG 抗体 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 20 min, 用洗液洗涤 4 次, 拍干。加邻苯二胺(OPD)和 H_2O_2 显色 10 min, 终止反应, 于 450 nm 测 A 值。

2 结果

2.1 表达质粒的构建与鉴定

将 RT-PCR 扩增得到的 681 bp SARS-CoV M 基因纯化后, 经 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切, 并与同样双酶切的表达质粒 pET-42(a) 连接, 转化大肠杆菌 BL21。从阳性克隆中提取质粒, 经双酶切、PCR



图 1 阳性克隆的鉴定

Fig.1 Detection of recombinant clone

M: DNA marker; 1: The digesting of *Kpn* I / *Xho* I; 2: Amplifying M gene by PCR from recombinant clone

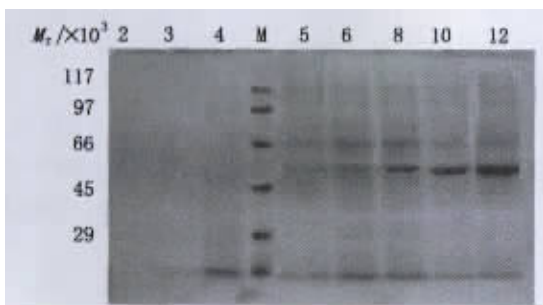


图 2 不同诱导时间 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 The result of SDS-PAGE of different inducing hours

M: Protein marker; 2, 3-12: the hours of inducing by IPTG

鉴定(图 1)以及序列测定得到结果和 SARS-CoV 的 M 基因序列一致, 读码框架正确, 表明表达质粒构建成功。

2.2 M 蛋白的表达

用 IPTG 诱导表达质粒克隆菌, 不同表达时间的克隆菌蛋白电泳结果表明, 诱导 4~5 h 目的蛋白开始表达, 7~8 h 即达高峰, 至 24 h 一直维持高峰(图 2)。菌体破碎后, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 发现表达产物主要位于上清中; 说明表达的 M 重组蛋白为可溶性蛋白, 没有形成包涵体。图 3 中可见其相对分子质量 $M_r \approx 52\ 000$ 。蛋白薄层扫描测定其表达量为总蛋白量的 34.8 % (图 4)。

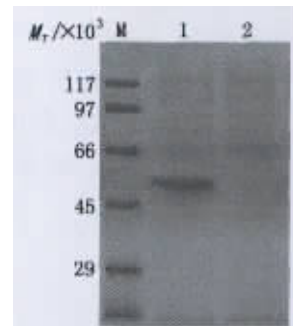


图 3 M 蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig.3 The protein M of SDS-PAGE

M: Protein marker; 1: Protein M of SARS-CoV; 2: The control of negative

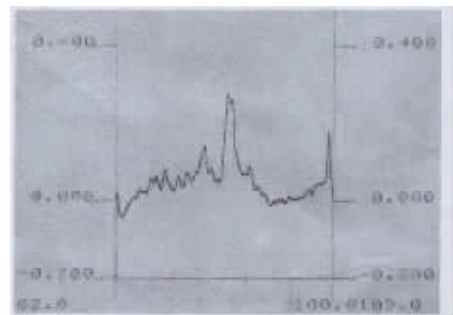


图 4 M 蛋白 SDS-PAGE 扫描结果

Fig.4 The protein M of scan from SDS-PAGE

2.3 鉴定表达产物

免疫印迹法结果显示(图 5), M_r 约 52 000 的蛋白质可与 SARS 患者恢复期血清特异性结合, 表明此种蛋白质是大肠杆菌分泌表达的 SARS-CoV M 蛋白。用表达蛋白对 10 份 SARS 患者恢复期血清和 10 份健康人血清进行 ELISA 检测, 结果显示前者均为阳性, 后者均为阴性。

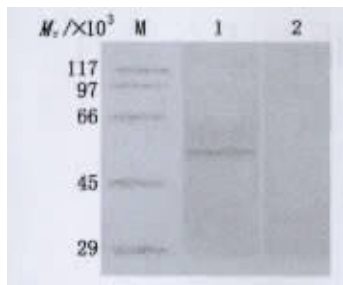


图5 M 蛋白免疫印迹结果

Fig.5 The protein M of Western-blotting

M: Protein marker; 1: Protein M of SARS-CoV; 2: The control of negative

3 讨论

SARS-CoV 是基因组最大的 RNA 病毒,其相对复杂的基因组编码多个结构和非结构蛋白。其中,碱基序列 26 389~27 063 nt 被推测编码病毒包膜(M)糖蛋白,作为连接核衣壳和病毒包膜的桥梁。M 蛋白为冠状病毒最丰富的蛋白质成分,抗 M 蛋白特异性单抗能在补体存在下中和病毒的感染性。此外,有研究表明 M 蛋白的 N 端可诱导宿主产生中和抗体。人们对冠状病毒科其它病毒如 IBV、MHV 和 BCV 等的研究表明 M 蛋白对于冠状病毒在感染细胞中装配、出芽释放和包膜形成等方面起重要作用^[7]。

本研究成功地用大肠杆菌表达了 SARS-CoV M 蛋白,表达出的融合 M 蛋白 $M_r \approx 52\ 000$,正好均为 $M_r = 26\ 000$ 的 SARS-CoV M 蛋白和 GST 蛋白的融合。并且在实验中发现通过降低诱导表达温度(28 °C)以及增加通气量,可以使诱导的 M 蛋白不以包涵体的形式存在,并且可以分泌表达,同时获得较高的表达量(34.8%)。大肠杆菌作为原核表达系统,操作简单,应用较普遍,缺点是所表达蛋白不能糖基化。但本实验发现,原核表达的 SARS-CoV M 蛋白依然有较好的免疫反应原性。同时本实验也说明 SARS 患者痊愈 1 个月后,体内仍存在较高滴度针对 M 蛋白的 IgG 抗体。另一

方面,表达的 M 蛋白与正常人血清无反应,尽管没有利用经典冠状病毒株或其感染人类的血清作进一步实验,鉴于经典冠状病毒感染的普遍性,可初步认为 SARS-CoV M 蛋白抗原可能与经典冠状病毒株无交叉。

对不同地区、不同流行时间所获得的 SARS-CoV 株进行序列分析^[8]发现,M 基因高度保守,变异很小,且变异不影响抗原性。因此,M 基因原核表达蛋白的获得,为进一步探讨 SARS 冠状病毒感染宿主细胞的过程和制备重组疫苗提供了基础。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Acute respiratory syndrome in China-update 3: 20 February 2003 disease outbreak reported [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/don/2003-2-20/en>.
- [2] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al*. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20):1953-66.
- [3] Poutanen SM, Low DE, Henry B, *et al*. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20):1995-2005.
- [4] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, *et al*. The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus [J]. *Science*, 2003, 300 (5624): 1399-404.
- [5] Enjuanes L, Smerdou C, Castilla J, *et al*. Development of protection against coronavirus induced diseases[J]. *A Review. Adv Exp Med Biol*, 1995,380:197-211.
- [6] 江丽芳,赵卫,晏辉钧,等. SARS 冠状病毒的分离培养和鉴定[J]. *中国病毒学*, 2003,18(6):544-7.
- [7] Escors D, Camafeita E, Ortego J, *et al*. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core[J]. *J Virol*, 2001,75(24):12228-40.
- [8] Liu WL, Lu Y, Chen YH. Bioinformatics analysis of SARS-CoV M protein provides information for vaccine development[J]. *Pro Nat Sci*, 2003,13(11): 844-7.

(编辑 张敏瑞)