

SARS 冠状病毒核衣壳(N)蛋白不同区域的原核表达

林鉴,葛胜祥,王颖彬,罗文新,吴婷,李少伟,程通,张军,夏宁邵

(福建省医学分子病毒学研究中心,厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,厦门 361005)

摘要:利用大肠杆菌表达系统对 SARS 冠状病毒的核衣壳(N)蛋白全长及 N 末端或/和 C 末端缺失突变体进行了表达,共表达了 39 个重组蛋白,表达量在 15%~30%之间。分别利用电洗脱或金属螯合介质纯化重组蛋白,用蛋白印迹实验检测纯化蛋白对 SARS 病人恢复期血清的反应性,结果发现全长 N 蛋白活性最好,其余的末端缺失蛋白均无法达到同一活性水平。由此说明 N 蛋白的完整性对于其优势表位的充分暴露是必要的。

关键词:SARS 冠状病毒;核衣壳蛋白;原核表达

中图分类号:R373.1 **文献标识码:**A **文献编号:**1000-8721(2005)02-0081-07

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)又称急性传染性非典型肺炎,具有急性发病、病死率高、传染性强等特点,成为严重危害人类健康乃至社会秩序的世界性公共卫生问题之一。2003 年 4 月,世界卫生组织(WHO)正式确认其病原体为一种新发现的人类冠状病毒,定名为 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)。SARS-CoV 的核衣壳蛋白(N 蛋白)长 422 个氨基酸,与其它冠状病毒的 N 蛋白只有 20%~30%的同源性,而 SARS-CoV 不同毒株 N 蛋白之间又高度保守。除全长的 N 蛋白外,在病毒裂解液的 SDS-PAGE 胶中,可看到一系列短的 N 蛋白^[1]。N 蛋白参与了病毒颗粒的组装,它通过第 184aa~196aa 间的一段富含 SR 的基序(SSRSSRSRGNSR)相互作用^[2],形成一个螺旋的核心,将病毒基因组包在里面。N 蛋白还与病毒基因组的转录有关,并且通过 AP-1 途径调节细胞的信号转导^[3]。

N 蛋白是病毒复制过程中表达拷贝数最多的结构蛋白,因此是机体抗 SARS-CoV 免疫应答的主要靶蛋白之一。Tan 等检测了 67 份 SARS 病人的恢复期血清及 7 个病人的急性期和恢复期双份血清中的抗体,结果显示:N 蛋白对所有的 81 份血清都有反应,而 S 蛋白对急性期的两份血清(发病 2~9 天)没有反应。表明 N 蛋白抗体的产生可能早于 S 蛋白^[4]。

目前已有报道,利用生物信息学方法预测了 N

蛋白的线性表位,并通过 20 个氨基酸左右的合成肽验证了部分线性表位的活性^[5]。合成肽无法再现出由不连续氨基酸组成的构象依赖性表位,为初步了解 N 蛋白上可能的构象依赖性表位的基本情况,本研究利用大肠杆菌系统表达了 39 个 N 蛋白的系列单/双末端缺失突变体,并用多份 SARS 患者恢复期血清进行了蛋白印迹检测。

材料与方 法

1 菌株和质粒 大肠杆菌 *E. coli* DH5a(克隆用)、*E. coli* ER2566(表达用)为本室保存。载体质粒 pET-30a 购自 Invitrogen 公司,含 T7 启动子,N 端有一段 His·Tag/凝血酶/S·Tag/肠激酶序列,C 端有一可选的 His·Tag 序列,它还含有抗卡那霉素的抗性选择基因,携带 SARS-CoV N 蛋白基因的质粒 pTO-T7-SN 为本室构建^[6]。

2 试剂 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶购自 Takara 公司,胶回收试剂盒购自上海华舜公司,亲和层析介质 TALON Metal Affinity Resins 购自 BD Biosciences 公司。

3 PCR 分段扩增 N 蛋白各区段的基因 根据 N 蛋白基因序列,用 DNASTAR 软件设计了 22 条引物(表 1)。5'端引物设计了 BamHI 或 BglII 两种同尾酶位点,3'端则设计了 EcoRI 位点。一些 5'端引物在 BglII 位点后加了一个 NdeI 位点,是为了后续实验,与本文无关。引物由上海生工公司合成。利用 22 条引物经不同组合 PCR 法扩增了 39 个 SARS 冠状病毒 N 蛋白基因片段(图 1)。PCR 条件:94℃ 5min,94℃ 1min,57℃ 1min,72℃ 50s,20 个循环后,72℃ 10min。胶回收试剂盒回收 PCR 产物,克隆至 pMD18-T 载体中(Takara 公司)。

4 SARS 冠状病毒 N 蛋白表达质粒的构建 利用引物上的内切酶位点,用 BamHI/EcoRI 或 BglII/EcoRI 双酶切,将基因片段从 pMD18-T 载体中切下来,再与预先用

收稿日期:2004-06-03;修回日期:2004-06-30

基金项目:教育部跨世纪优秀人才培养计划(2002)

通讯作者:夏宁邵, Tel:86-592-2184110; Fax:86-592-2181258;

E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

Serial no.	5'primer	3'primer	PCR amplified N protein gene fragments	Name
1	NF1	NR422	1-----422	N422
2	NF1	NR360	1-----360	N360
3	NF1	NR320	1-----320	N320
4	NF1	NR301	1-----301	N301
5	NF1	NR267	1-----267	N267
6	NF1	NR228	1-----228	N228
7	NF1	NR214	1-----214	N214
8	NF1	NR204	1-----204	N204
9	NF1	NR194	1-----194	N194
10	NF1	NR184	1-----184	N184
11	NF1	NR170	1-----170	N170
12	NF1	NR160	1-----160	N160
13	NF1	NR150	1-----150	N150
14	NF1	NR140	1-----140	N140
15	NF30	NR422	30-----422	N393
16	NF60	NR422	60-----422	N363
17	NF140	NR422	140-----422	N283
18	NF267	NR422	267-----422	N156
19	NF30	NR360	30-----360	N331
20	NF60	NR360	60-----360	N301b
21	NF140	NR360	140-----360	N221
22	NF140	NR320	140-----320	N181
23	NF30	NR301	30-----301	N272
24	NF60	NR301	60-----301	N242
25	NF140	NR301	140-----301	N162
26	NF30	NR267	30-----267	N238
27	NF60	NR267	60-----267	N208
28	NF140	NR267	140-----267	N128
29	NF30	NR228	30-----228	N199
30	NF60	NR228	60-----228	N169
31	NF90	NR228	90-----228	N139
32	NF120	NR228	120-----228	N109
33	NF140	NR228	140-----228	N89
34	NF30	NR214	30-----214	N185
35	NF60	NR214	60-----214	N155b
36	NF90	NR214	90-----214	N125
37	NF120	NR214	120-----214	N95
38	NF140	NR214	140-----214	N75
39	NF30	NR184	30-----184	N155

图 1 表达片段及引物

Figure 1 The expressed N protein gene fragments and their primers

*Bam*HI / *Eco*RI 处理好的 pET-30a 载体连接,得到系列表达质粒(图 2)。

5 重组蛋白的表达 小量表达鉴定:取连接物转化 *E. coli* ER2566 感受态细胞,37℃ 培养 9h 后挑取菌落到 2ml LB 培养基中,当 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时加入 IPTG,使终浓度达到 0.5mmol/L,37℃ 诱导培养 4h。用 13.5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定是否有重组蛋白表达。

大量表达获得目的蛋白:接种 10μl 左右的甘油菌至 500ml LB 培养基中,37℃ 培养 10h,培养至 OD₆₀₀ 达 1.5 左右,加入 IPTG 至 0.4mmol/L,37℃ 诱导 4h。离心(8 000r/min)收集菌体,超声破碎后离心(12 000r/min),上清和重悬后的沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。若表达在沉淀中,进一步进行包涵体洗涤。

表 1 SARS-CoV N 蛋白基因分段克隆引物

Table 1 The primers for amplification of SARS-CoV N protein gene fragments

Primer	Sequence	Position	Cleavage site
NF1	<u>aga tct</u> cat atg tct gat aat gga ccc caa	28123 - 28140	<i>Bgl</i> II, <i>Nde</i> I
NF30	<u>gga tcc</u> tgg agg acg caa tgg ggc	28209 - 28226	<i>Bam</i> HI
NF60	<u>aga tct</u> tgg caa gga gga act tag	28299 - 28316	<i>Bgl</i> II
NF90	<u>gga tcc</u> agc tac cag acg agt tc	28389 - 28405	<i>Bam</i> HI
NF120	<u>gga tcc</u> ttc act tcc cta cgg cgc	28479 - 28496	<i>Bam</i> HI
NF140	<u>gga tcc</u> cat atg aat aca ccc aaa gac cac at	28540 - 28599	<i>Bgl</i> II, <i>Nde</i> I
NF267	<u>gga tcc</u> cat atg aaa cag tac aac gtc act caa g	28918 - 28939	<i>Bgl</i> II, <i>Nde</i> I
NR140	<u>gaa ttc</u> tta caa ggc tcc ctc agt tgc aac	28519 - 28539	<i>Eco</i> RI
NR150	<u>gaa ttc</u> tta gcg ggt gcc aat gtg gtc	28552 - 28569	<i>Eco</i> RI
NR160	<u>gaa ttc</u> tta tag cac ggt ggc agc att	28582 - 28599	<i>Eco</i> RI
NR170	<u>gaa ttc</u> tta ttt tgg caa tgt tgt tcc	28612 - 28629	<i>Eco</i> RI
NR184	<u>gaa ttc</u> tta aga ggt ttg act gcc gcc	28654 - 28671	<i>Eco</i> RI
NR194	<u>gaa ttc</u> tta att acc cgc act acg tga	28684 - 28701	<i>Eco</i> RI
NR204	<u>gaa ttc</u> tta cct act gct gcc agg agt	28714 - 28731	<i>Eco</i> RI
NR214	<u>gaa ttc</u> tta tcc gct agc cat tcg ag	28744 - 28760	<i>Eco</i> RI
NR228	<u>gaa ttc</u> tta caa tct gtc tag cag caa tag	28783 - 28803	<i>Eco</i> RI
NR267	<u>gaa ttc</u> tta ttt tgt ggc agt acg ttt	28903 - 28920	<i>Eco</i> RI
NR301	<u>gaa ttc</u> tta atg ttt gta atc agt tcc ttg tct	28999 - 29022	<i>Eco</i> RI
NR320	<u>gaa ttc</u> tta gcg tga cat tcc aaa gaa	29062 - 29079	<i>Eco</i> RI
NR360	<u>gaa ttc</u> tta tgc gtc aat gtg ctt gtt	29182 - 29199	<i>Eco</i> RI
NR422	<u>gaa ttc</u> tta tgc ctg agt tga atc a	29370 - 29385	<i>Eco</i> RI

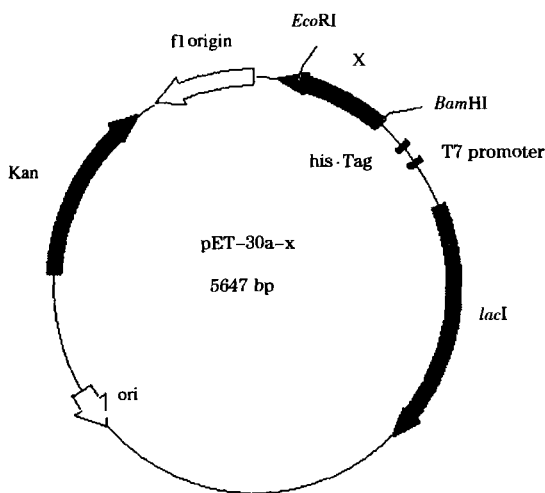


图 2 表达质粒图(X 代表 39 个靶基因片段之一)

Figure 2 The map of expression plasmid

(X represents for anyone of the 39 target gene fragments)

6 重组蛋白的纯化 重组蛋白 N 端融合表达了 His 标签, 因此可用 BD Biosciences 公司的 TALON Metal Affinity Resins 介质纯化。将要纯化的蛋白粗品预先透析到 TBS (20mmol/L Tris·Cl, 500mmol/L NaCl, pH8.0) 中; 用 20 倍柱体积的 TBS 平衡介质; 混合介质与蛋白, 在摇床上轻摇, 室温结合 30min; TBS 洗去没有结合介质的蛋白, 至洗出的 TBS 中摇不出泡沫; 30mmol/L 咪唑/TBS 洗去非特异结合

的杂蛋白; 100mmol/L 咪唑/TBS 洗出特异结合的目的蛋白。

传统的电洗脱方法纯化重组蛋白。配制适合浓度的不连续聚丙烯酰胺凝胶, 蛋白粗样品进行垂直电泳。电泳结束后, 竖着切下一小条凝胶, 用 0.3mol/L 的 CuCl_2 染色。将目的蛋白从相应的位置切下来, 切下来的胶条装入透析袋, 加入一定量的电泳缓冲液, 100V, 80mA, 在水平电泳槽中电泳 2h。收集透析袋中溶液, SDS-PAGE 分析纯度。

7 重组蛋白的蛋白印迹检测 按常规方法操作, 样品经 SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜进行杂交。一抗为 SARS 患者恢复期血清 (经 56°C 30min 灭活病毒) 或阴性混合血清 (5 份阴性血清等量混合), 二抗为羊抗人 Ig-AP (购自晶美公司)。

结 果

1 系列 N 重组蛋白的表达

39 个重组蛋白中, PN139、PN169、PN181、PN221、PN238、PN301b、PN331、PN393 主要表达为包涵体, 其余均主要为可溶性表达, 表达量在 15% ~ 30% 之间 (图 3)。

2 系列 N 重组蛋白的纯化

如图 4 所示, 第 2 道 PN150、第 7 道 PN204、第 8 道 PN214 和第 14 道 PN422 是用亲和层析纯化的, 除 PN422 纯化效果较好外, 另外 3 个纯化效果

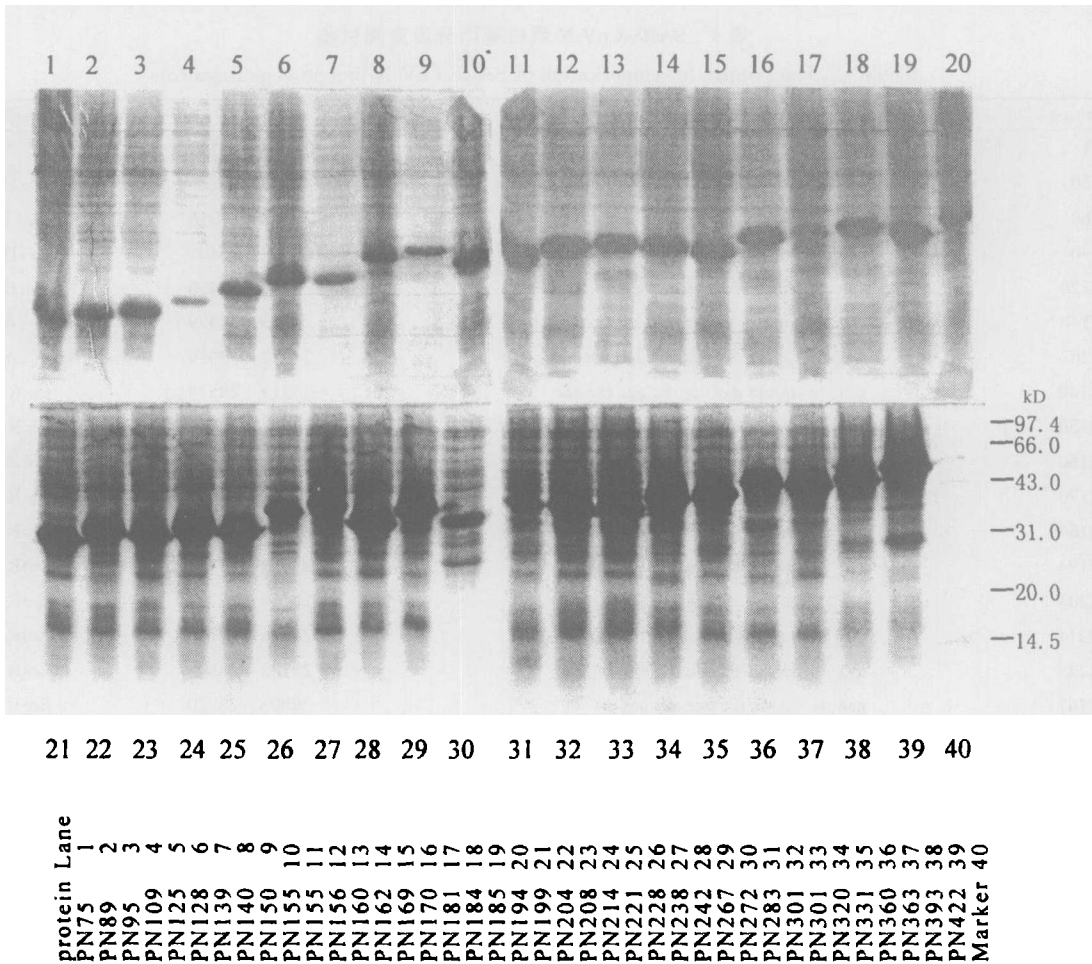


图 3 不同工程菌菌体的 SDS-PAGE

Figure 3 The SDS-PAGE of different engineering bacteria bodies

均不理想。其余蛋白均采用先硫酸铵沉淀再电洗脱的方法纯化,纯化效果较好,纯度都在 85% 以上。

3 系列 N 重组蛋白的蛋白印迹检测

用 9 份 SARS 病人恢复期血清和 1 份阴性混合血清,对纯化后的系列 N 重组蛋白进行蛋白印迹检测(Western blot),结果在 39 个重组蛋白中,包含完整 N 蛋白的 PN422 抗原活性最强,对全部 9 份恢复期血清均有良好反应(图 5)。

N 蛋白的 C 端缺失到 aa360(PN360)时活性基本丧失,但继续缺失到 aa320(PN320)时其活性有所恢复;C 端缺失到 aa301 时活性减弱,而缺失到 aa267 时活性又有所恢复。在 C 端缺失突变体中,缺失到 aa228 的 PN228 的活性相对最强,但也弱于完整的 N 蛋白。C 端缺失到 aa170~aa214 的 5 个突变体活性基本一致,均对血清 S3、S63、Bs1、Bs5 和 Bs8 有一定反应,而且强度相当,对其它 4 份血清反应则不明显。C 端缺失到 aa160 以上的 3 个突变体(PN140、PN150、PN160)均未见明显活性。

全长 N 蛋白(PN422)的 N 端缺失至 aa30(PN393),其活性显著降低,而且对阴性血清也出现一定的交叉反应。提示 PN393 的空间结构与 PN422 有较大的不同。N 端缺失至 aa60(PN363)其活性与 PN393 相当,但与阴性血清没有反应。N 端缺失至 aa140(PN283)时,仅对 1 份阳性血清有反应,而进一步缺失至 aa267(PN156)时,活性完全消失。

在 N 端和 C 端同时缺失的 21 个突变体中,仅 PN331(aa30~aa360)和 PN242(aa60~aa301)活性相对较好,可对 5 份以上阳性血清有较好的反应,但二者对阴性血清均有一定反应。

讨 论

本研究利用大肠杆菌表达系统对 SARS 冠状病毒的 N 蛋白进行了全长以及 N 末端或/和 C 末端缺失突变体的表达,共构建了 39 个表达质粒,结果均

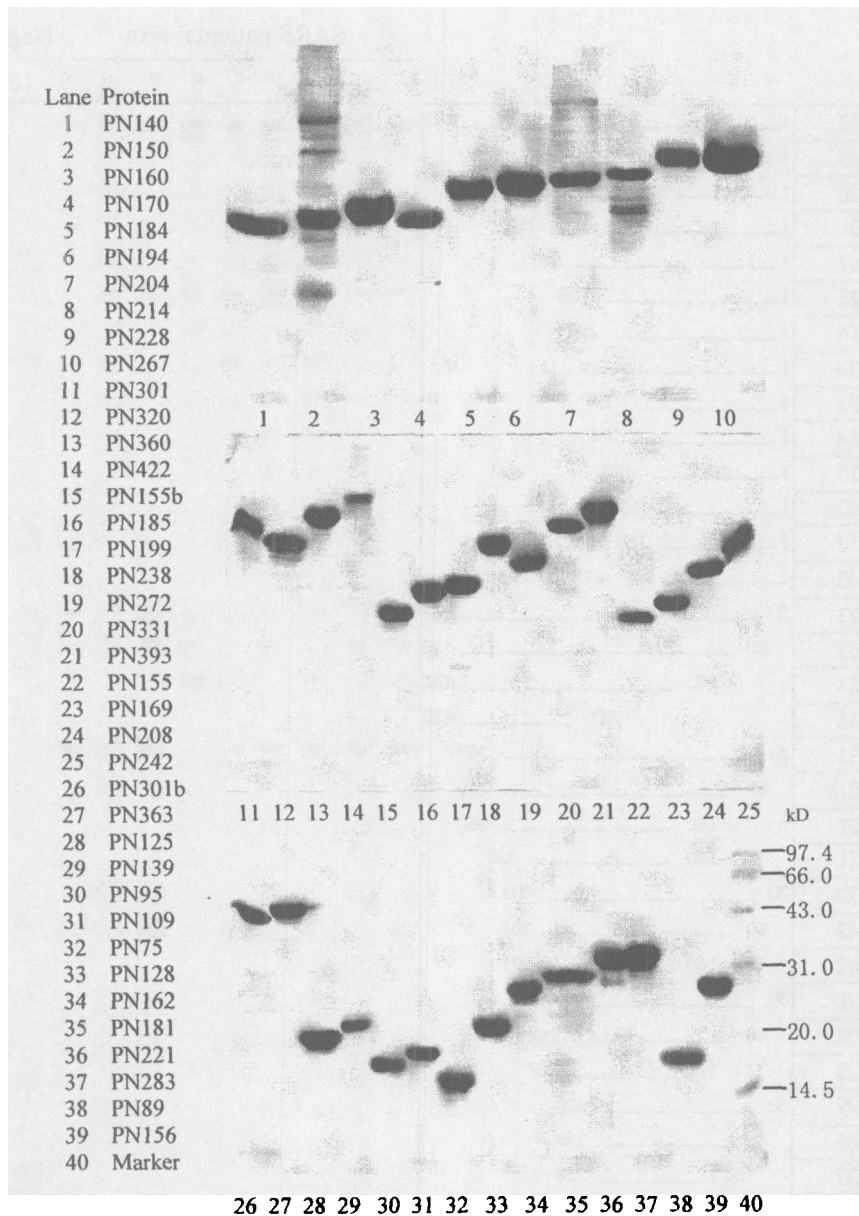


图 4 纯化后的重组蛋白
Figure 4 The purified recombinant proteins

获得了成功,表达产量都在 15% 以上,表明 N 蛋白较易实现原核表达。在这 39 个重组蛋白中,全长 N 蛋白(PN422)的活性明显强于它的缺失突变体,对全部 9 份 SARS 病人恢复期血清均有较强反应性,证实了 SARS-CoV 的 N 蛋白是机体免疫应答的优势靶蛋白之一。N 蛋白的 N 末端缺失和 C 末端缺失都会显著影响 N 蛋白的活性,但各个缺失突变蛋白的活性变化未见明显的规律性,而且仅有 1 个蛋白(PN228)对个别血清的反应强度能够达到 PN422 的水平。提示 N 蛋白的完整性对于其优势表位的充分暴露具有重要意义,同时提示 N 蛋白上的构象依赖性表位在抗体应答中占有重要地位。在本实验

室另外的研究中发现,酵母表达的全长 N 蛋白的活性较 PN422 的活性有明显提高,提示重组 N 蛋白的应用需考虑构象的正确程度^[7]。

另外一点值得注意的是,有多个 N 蛋白的缺失突变体一方面对 SARS 恢复期血清的反应性减弱,另一方面却对阴性混合血清产生了一定的交叉反应,提示使用抗 N 蛋白抗体作为 SARS 冠状病毒感染的诊断依据时,需特别注意排除假阳性问题。这种假阳性除了可因所使用的 N 抗原的纯度不足造成外,还有可能是由 N 蛋白本身与其它未知抗原之间的交叉反应造成,而后者是无法通过单一蛋白的 Western blot 来排除的。

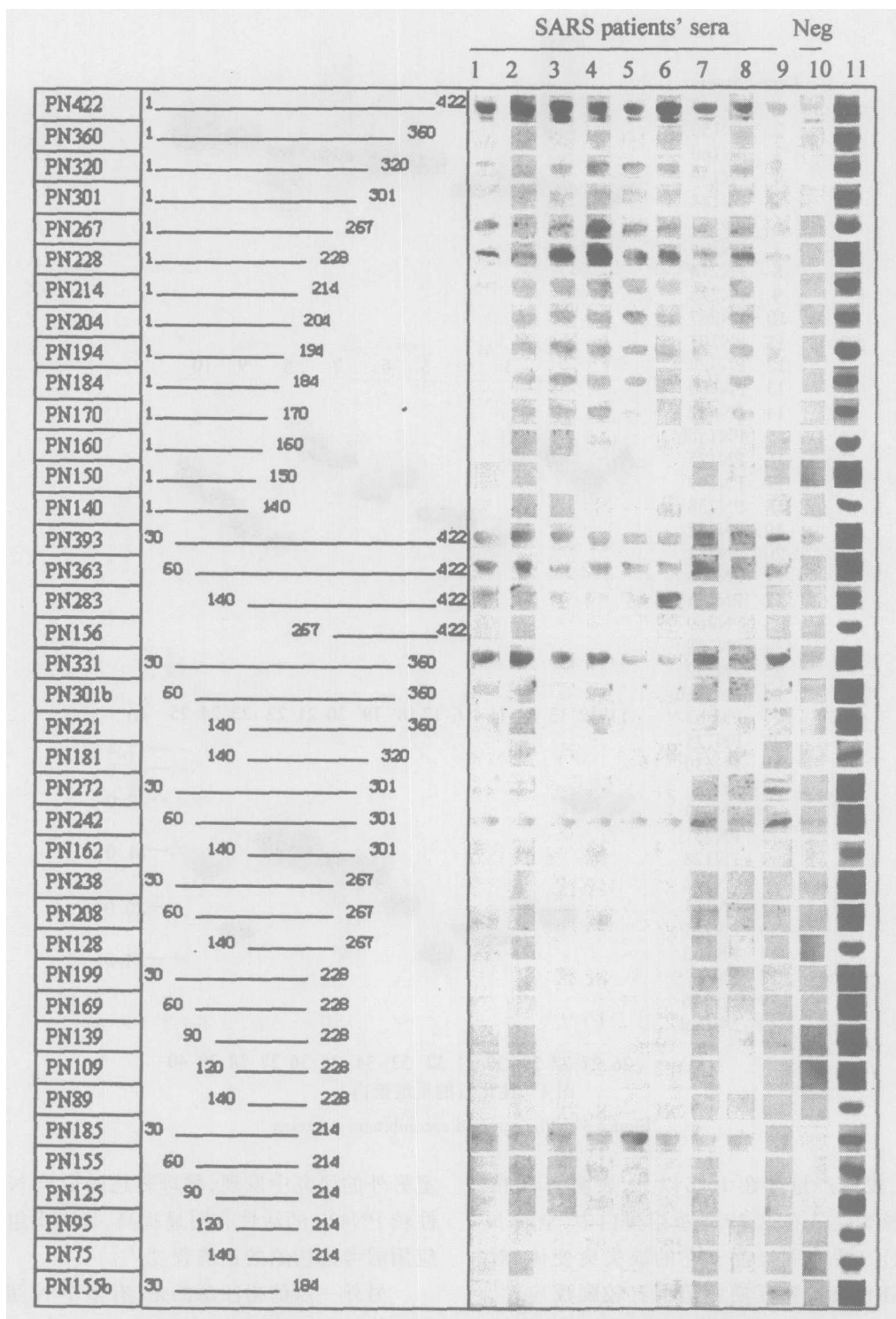


图 5 不同重组蛋白对 SARS 病人恢复期血清的蛋白印迹检测

Figure 5 Western blotting of different recombinant proteins against convalescent sera of SARS patients. Lane 1 to 10 showed the Western blotting. Sera used in lane 1 to 9 were from SARS patients, in lane 10 was from a pool of five negative individuals. Lane 11 were proteins in SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.

参考文献:

[1] Ying W, Hao Y, Zhang Y, et al. Proteomic analysis on structural proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus[J]. Pro-

teomics, 2004, 4(2): 492 - 504.

[2] He R, Dobie F, Ballantine M, et al. Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(2): 476 - 483.

- [3] He R, Lesson A, Andonov A, et al. Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(4): 870 - 876.
- [4] Fan K, Wei P, Feng Q, et al. Biosynthesis, purification, and substrate specificity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like proteinase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 1637 - 1642.
- [5] Wang J Q, W J, Li J X. Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 1989 - 1999.
- [6] 王颖彬, 葛胜祥, 林鉴, 等. 传染性非典型肺炎病毒核蛋白的表达与活性检测 [J]. *厦门大学学报*, 2003, 42(4): 416 - 420.
- [7] Liu R S, Yang K Y, Lin J, et al. High-yield expression of the recombinant SARS-CoV nucleocapsid protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *World J Gastroenterol*, 2004 (accepted).

Prokaryotic Expression of Different Regions of SARS-CoV Nucleocapsid Protein

LIN Jian, GE Sheng-xiang, WANG Ying-bin, LUO Wen-xin, WU Ting,

LI Shao-wei, CHENG Tong, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(The Research Center for Molecular Virology of Fujian Province, The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Nucleocapsid(N) protein of the severe acute respiratory syndrome associated coronavirus(SARS-CoV), and its N or/and C terminal truncated mutants were expressed in *E. coli*. The yield levels of these thirty-nine recombinant proteins were from 15% to 30%. Recombinant proteins were purified by metal chelated affinity chromatography or by electro-elution. Western blot was used to detect the reactivity of these proteins with the convalescent sera of SARS patients. The results showed that the reactivity of the full length N protein is the best, which suggests that the integrity of N protein is important for exposure of the prominent epitopes.

Key words: SARS-CoV; nucleocapsid protein; prokaryotic expression