

传染性非典型肺炎病毒核蛋白的 表达与活性检测

王颖彬,葛胜祥,林 鉴,程 通,李少伟,
何志强,欧山海,张 军,夏宁邵*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要: 用 PCR 方法,人工合成传染性非典型肺炎病毒(SARS-CoV)核蛋白(N)全编码基因,并构建原核表达载体,在大肠杆菌中进行表达.结果重组 N 蛋白表达产量占菌体总蛋白的 40%以上,主要以可溶形式存在.用 SARS 患者急性期血清进行蛋白印迹检测,表明可溶形式和包含体形式均有明显活性.包含体形式的重组蛋白经纯化后纯度可达 90%以上,活性与纯化前相当,可作为 SARS 抗体诊断试剂盒的抗原原料.

关键词: 传染性非典型肺炎;核蛋白;原核表达

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

传染性非典型肺炎,又称严重急性呼吸综合征(SARS),是人类新认识的高致死性烈性传染病.由于 SARS 病毒主要经呼吸道传播,传染性极强,病死率高,已对我国的社会生活秩序造成了严重影响,并造成了重大的经济损失^[1~5].世界卫生组织(WHO)SARS 全球科研协作组 2003 年 3 月成功地从 SARS 患者中分离到了一种新型冠状病毒(SARS-CoV),并测出了其基因组全序列^[6,7].香港学者发现在 50 例 SARS 病人中有 45 例有 SARS-CoV 感染的证据,而对照的 40 例其他呼吸系统疾病患者和 200 个献血员中无一有 SARS-CoV 感染,从而强有力的证实了 SARS-CoV 是本次 SARS 暴发的病原体^[8]. SARS-CoV 的基因组为约 30 kb 的单股正义 RNA,其与传统冠状病毒具有较大的遗传距离,但具有相似的基因组结构特征和病毒形态. SARS 的特异性诊断依赖于病毒核酸或特异性抗体的检测.病毒核酸的检测主要依靠反转录聚合酶链反应(RT-PCR),仅有少数实验室具有检测能力,难

以广泛应用.由于 SARS-CoV 细胞培养的成功,目前特异性抗体的检测主要采用间接免疫荧光法(IFA),以及使用纯化病毒裂解物为抗原建立的酶联免疫吸附法(ELISA),二者均需依赖于大量的病毒培养,其制备过程危险,成本较高,而且灵敏度和特异度也不理想.本研究利用 PCR 方法,人工合成了 SARS-CoV 核蛋白(N)的全编码基因,并进行了原核表达和活性测定,为利用基因工程技术大量制备 SARS-CoV 抗原奠定了基础.

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌种

PCR 产物克隆 T 载体 pMD18 购自宝生物公司,非融合表达载体 pTO-T7 为本实验室所构建与保存^[9],受体菌 *E. coli* ER2566 亦为本室保存.

1.2 工具酶及其它

限制性核酸内切酶、*Taq*DNA 聚合酶购自宝生物公司,其他生化药品购自 Sigma 公司或国产分析纯.

1.3 引物设计与合成

根据加拿大克隆出的 SARS-CoV 基因序列(GenBank 登录号 AY274119.3, nt 28, 120-29, 388),设计并合成 21 条 PCR 引物(表 1)(引物合成由上海博亚公司完成).5'端引物 SNF1 和 3'端引物

收稿日期:2003-05-18

基金项目:教育部跨世纪优秀人才培养计划资助

作者简介:王颖彬(1975-)女,实习研究员.

* Corresponding author:夏宁邵,男,研究员.

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

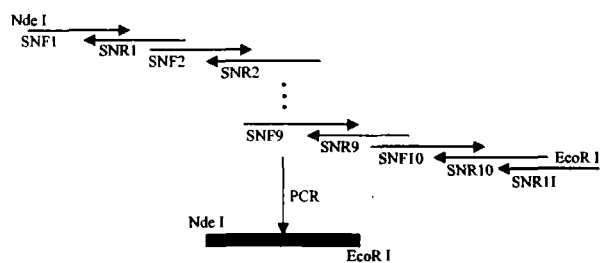


图 1 PCR 合成基因示意图

Fig. 1 Sketch map of gene synthesis by PCR

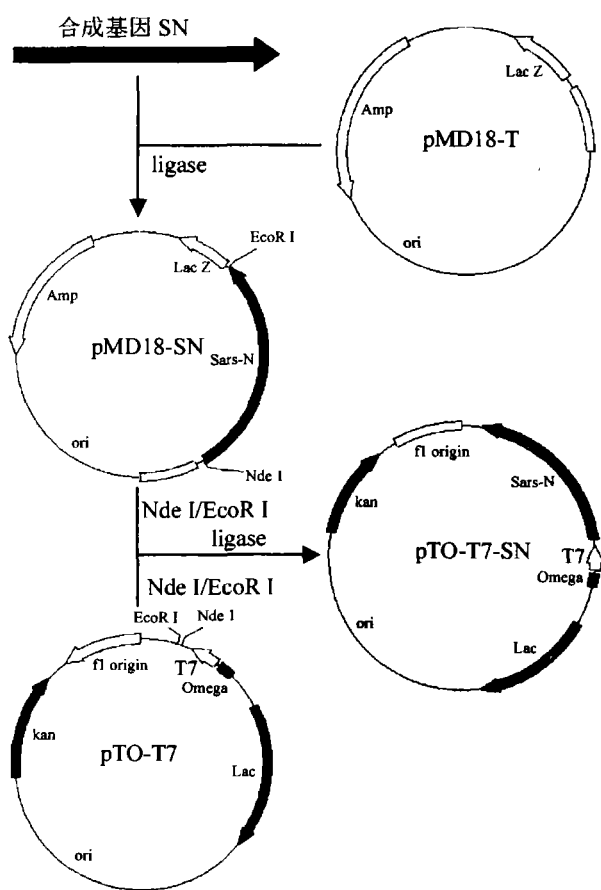


图 2 表达载体 pTO-T7-SN 的构建

Fig. 2 Construction of expression vector pTO-T7-SN

SNR1 的 5' 端分别带有 Nde I 和 EcoR I 酶切位点。

1.4 N 蛋白基因的 PCR 合成和表达载体的构建

如图 1 所示逐步进行 PCR 扩增。高保真 *Pyrobest* DNA 聚合酶和 Taq DNA 聚合酶、dNTP 为宝生物公司产品。首先进行引物 SNF1/SNR1、SNF2/SNR2……SNF10/SNR10 的扩增,PCR 条件为 94℃ 30 s,68℃ 3 min,5 个循环后各取 0.5 μL

SNF1/SNR1 产物和 SNF2/SNR2 产物为模板,用引物 SNF1 与 SNR2 扩增 5 个循环,类似地逐步扩增 SNF3~SNR4 片段、SNF5~SNR6……SNF9~SNR10 片段,再逐步扩增 SNF1~SNR4 片段、SNF5~SNR8 片段、SNF9~SNR11 片段,以及 SNF1~SNR8 片段;最后一轮扩增以 SNF1~SNR8 产物和 SNF9~SNR11 产物为模板,引物为 SNF1 和 SNR11,反应体积 100 μL,25 个循环后加入 1u 普通 Taq 酶,72℃ 后延伸 10 min,用胶回收试剂盒(上海华舜公司)回收产物,克隆入 pMD18-T 载体,获得插入完整 SARS-CoV N 蛋白基因的 pMD18-SN 质粒,进行双向测序(由上海博亚公司进行)。用 Nde I/EcoR I 双酶切 pMD-18-SN 质粒,回收 1.3 kb 片段,插入 Nde I/EcoR I 处理的 pTO-T7 质粒中,获得表达载体 pTO-T7-SN,以 Nde I/Nhe I 进行酶切鉴定。

1.5 重组蛋白的表达与纯化

诱导表达的条件为 37℃,0.5 mmol/L IPTG,4 h。离心收集菌体,超声(SONICS& MATERIALS 公司,Uilbra-Cell VCX500 型超声破碎仪)破碎,超声上清经 30% 的饱和硫酸铵沉淀后,用 1×PBS (pH7.45)溶解,对 1×PB(pH7.45)透析过夜,离心后上清再经 TSK DEAE-5PW 离子交换柱及 GEL SW3000 硅胶柱 HPLC(Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP 高效液相色谱仪)纯化,获得的重组多肽命名为 SN。

1.6 蛋白印迹实验(Western blotting)

按常规方法操作,样品经 12% SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜进行杂交,一抗为 SARS 患者急性期病人血清,经 56℃ 30 min 灭活病毒。二抗为羊抗人 Ig-AP(购自晶美公司)。

2 结果

2.1 SARS-CoV N 蛋白基因的合成与表达载体的构建

根据最早公布的 SARS-CoV 基因组序列,设计了 21 条引物,用拉链 PCR 的方法逐步合成了 SARS-CoV 的 N 蛋白基因,获得约 1.3 kb 的产物片段(图 1),插入 pMD18-T 载体内,经双向测序验证无误。以 Nde I/EcoR I 双酶切切出 1.3 kb 的 N 蛋白基因片段,插入原核表达载体 pTO-T7 中,获得非融合表达完整 N 蛋白的表达载体 pTO-T7-SN

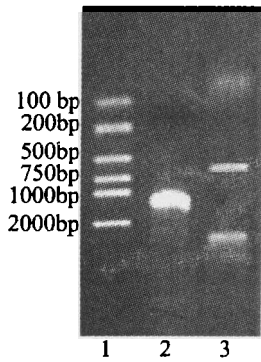


图 3 合成基因片段和 pTO-T7-SN 质粒的酶切片段的 DNA 电泳

1: Molecular weight marker; 2: PCR synthesized gene; 3: Nde I/Nhe I digested plasmid

Fig. 3 DNA electrophoresis of PCR synthesized gene and endonuclease digested pTO-T7-SN

(图 2). Nde I/Nhe I 双酶切, 切出约 634 bp 片段, 与预计相符(图 3), 表明质粒构建无误.

2.2 SARS-CoV N 蛋白的表达与纯化

由图 4A 可见, 重组 N 蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 40%(图 4A, 第 2 道), 几乎完全位于菌体裂解上清中(图 4A, 第 3 道), 主要呈可溶性表达, 而包含体形成较少(图 4B, 第 4 道). 上清蛋白经 1 次

离子交换柱层析纯化, 纯化蛋白即达电泳单一纯(纯度 > 90%, 图 4B, 第 5 道), 纯化得率约 70%.

2.3 蛋白印迹检测

由图 4B 可见, 可溶性的重组 N 抗原与包含体形式 N 抗原以及纯化后的 N 抗原与 SARS 患者急性期血清的反应性均类似, 表明纯化过程并未导致重组抗原活性的下降.

3 讨论

SARS-CoV 的主要结构蛋白包括突起糖蛋白(S 蛋白)、膜蛋白(M)、小膜蛋白(E)以及核蛋白(N), 前三者参与病毒包膜的形成, 包含大量的疏水区域和糖基化位点, N 蛋白与病毒基因组紧密结合, 组成核衣壳^[6,7]. N 蛋白由 422 个氨基酸组成, 不包含糖基化位点和明显的疏水区域, 因此易于在原核表达中形成正确的空间构象, 并获得较高的表达量; 另外, N 蛋白在病毒体内含量丰富, 是机体抗 SARS-CoV 免疫应答的主要靶蛋白之一, 因此本研究选取 N 蛋白进行原核表达.

根据国际上报告的第一个 SARS-CoV 基因组序列, 我们利用引物 PCR 合成法人工合成了 N 蛋白的全编码基因. 为尽可能减少 PCR 导致的突变的发生, 我们使用了高保真 DNA 聚合酶, 同时采用双

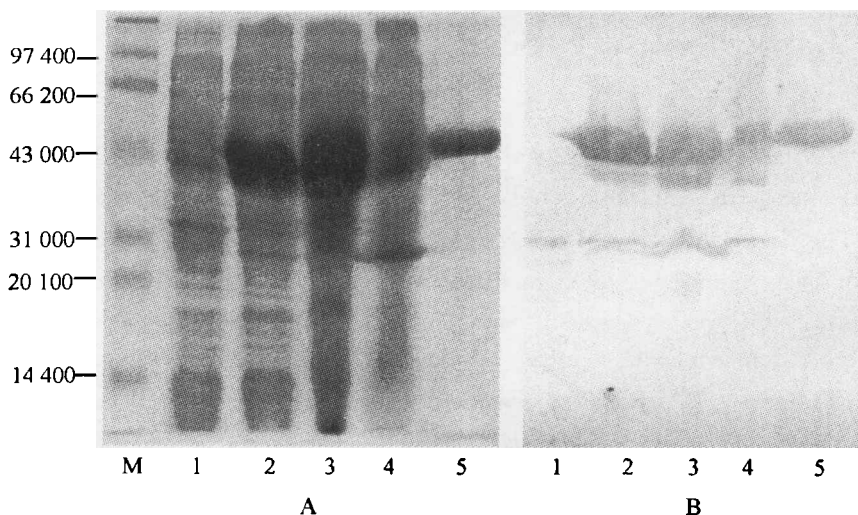


图 4 重组 N 抗原的表达、纯化与蛋白印迹实验

A: SDS-PAGE; B: Western blotting; M. 蛋白分子量; 1. 对照空菌体; 2. 转化菌; 3. 菌体裂解上清; 4. 菌体裂解沉淀; 5. 纯化抗原

Fig. 4 Expression, purification and Western blotting of recombinant N antigen

M. protein molecular weight marker; 1. Control bacteria; 2. Transformed bacteria; 3. Suspension of lysis transformed bacteria; 4. Deposit of lysis transformed bacteria; 5. Purificated antigen

温 PCR 法提高复性温度,并控制循环数不超过 25 个循环.由于高保真 DNA 聚合酶产物末端不加 A,我们在 PCR 后延伸过程中加入了普通 Taq DNA 聚合酶,使产物末端加入 1 个 A,提高了 PCR 产物插入 T 载体的效率.这些措施保障了基因合成的效率,最后获得的 N 蛋白基因经双向测序,证实与目标序列完全一致.

为避免融合蛋白造成的非特异反应,我们将 N 蛋白基因以非融合方式克隆入我们自行构建的高效原核表达载体 pTO-T7 中,使表达产物仅包含自身氨基酸序列.结果表达质粒转化的工程菌中,重组 N 抗原的表达量达到菌体总蛋白的 40%,而且主要以可溶形式存在.上清蛋白仅需经 1 次离子交换纯化即可达到 90% 以上纯度,蛋白印迹实验证实纯化蛋白依然具有良好的活性.高表达产量、简易高效的纯化方式以及纯化蛋白的高免疫活性使其可容易地实现工艺放大,从而具有成为 SARS 抗体诊断试剂生产原料的良好应用前景.

参考文献:

- [1] WHO. Severe acute respiratory syndrome (SARS) [J]. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 2003, 78: 86.
- [2] Tsang K W, Ho P L, Ooi G C, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348: 1 977—1 985.
- [3] Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kongs [J]. *N Engl J Med.* 2003, 348: 1 986—1 994.
- [4] Poutanen S M, Low D E, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348: 1 995—2 005.
- [5] Donnelly C A, Ghani A C, Leung G M, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong [J]. *Lancet.* 2003, 361: 1 761—1 766.
- [6] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *Science*, 2003, 300: 1 394—1 399.
- [7] Marra M A, Jones S J, Astell C R, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus [J]. *Science*, 2003, 300: 1 399—1 404.
- [8] Peiris J S, Lai S T, Poon L L, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361: 1 319—1 325.
- [9] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16: 53—57.

Expression and Activity Determination of Nucleoprotein of Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome

WANG Yin-Bin, GE Sheng-xiang, LIN Jian, CHENG Tong, LI Shao-wei,
HE Zhi-qiang, OU Shan-hai, ZHANG Jun, XIA Ning-shao
(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and
Tumor Cell Engineering in Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The complete coden sequence of nucleoprotein (N) of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) was synthesized by PCR. The N gene was cloned into a prokaryotic expression plasmid, and expressed in *E. coli*. The expressed recombinant N protein accounted for more than 40% quantity of bacterial total protein, and most existed as soluble protein. The Western blotting using a SARS patient acute phase serum showed that both soluble protein and insoluble protein had obvious reactivity. More than 90% purity can be obtained after purification, and the reactivity with serum remained similar to that of pre-purification, so can be used as antigen for the production of SARS antibody diagnosis kit.

Key words: severe acute respiratory syndrome; nucleoprotein; prokaryotic expression