

## SARS 病毒核衣壳蛋白、膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达和纯化

易艳萍<sup>1</sup> 李楚芳<sup>1</sup> 石玉岭<sup>2</sup> 李林海<sup>2</sup> 李平<sup>1</sup> 黄维<sup>1</sup> 王升启<sup>3</sup> 马清钧<sup>1</sup> 曹诚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

<sup>2</sup>(广州军区总医院检验科,广州 510010)

<sup>3</sup>(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

**摘 要** 通过反转录-PCR 获得了 SARS 冠状病毒核衣壳蛋白(N)和膜蛋白(M)基因,其序列分析结果与加拿大多伦多株完全一致。将 M 基因和 N 基因克隆到大肠杆菌表达载体 pET22b 和 pBV222 上,并在大肠杆菌中以包涵体及可溶形式获得高效表达。通过离子交换、金属螯合层析纯化获得电泳纯制品。所获得的核衣壳蛋白具有良好的抗原性,可用于抗 SARS 抗体检测及亚单位疫苗研究。

**关键词** SARS 病毒,核衣壳蛋白,膜蛋白,表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0392-05

严重急性呼吸系统综合症(SARS)通常被称为非典型肺炎)的流行给人民的身体健康和社会、经济发展带来了巨大的威胁,建立快速、准确的早期诊断方法可以使疑似病人尽早确诊,从而减少交叉感染和社会负担,在诊断问题解决后,研制特效的治疗药物和有效的疫苗进行免疫预防成为迫切需求。

非典型肺炎是由一种新的冠状病毒<sup>[1,2]</sup>引起的,这种病毒具有与其他冠状病毒类似的基因结构。根据其他冠状病毒的研究结果,推测 SARS 病毒含有 4 个结构基因:位于病毒表面的辐条样蛋白(S 蛋白)、外膜蛋白(E 蛋白)、膜蛋白(M)及核衣壳蛋白(N)<sup>[3,4]</sup>。SARS 病毒出现之前,人冠状病毒仅引起轻度感冒等上呼吸道症状,对其免疫原性和疫苗的研究极少。动物冠状病毒引起禽类感染性支气管炎、猪传播性胃肠炎等疾病。特别是猪传播性胃肠炎病毒(TGEV)可以选择性地在 2 周龄以下新生猪小肠纤毛表面的肠道细胞中复制,引起严重的腹泻、脱水,具有很高的得病率和病死率(近 100%)<sup>[5]</sup>。有关冠状病毒免疫原性和免疫预防的研究结果几乎全部来源于对 TGEV 的研究。研究表明,S 蛋白是病毒的主要保护性抗原,N 蛋白和 M 蛋白也可以诱导免疫效应<sup>[6]</sup>,特别是病毒的核衣壳蛋白,一般是检测病毒抗体的良好抗原,S 蛋白及 N、M 蛋白均可应用于抗 SARS 疫苗研究。目前 SARS 病毒的诊断主

要有基于基因检测的实时定量 PCR,以及基于抗体检测的免疫荧光和酶联免疫分析(ELISA),但所用抗原为病毒感染细胞或病毒蛋白,其制备需要 P3 实验室,并有较大风险。因此,获得大量的重组抗原对于疫苗和诊断试剂的研究具有重要意义。由于 S 蛋白是高度糖基化的蛋白,且其主要的抗原表位的抗原性依赖于蛋白构象和糖基化<sup>[7]</sup>,适合在真核系统中表达。本研究通过反转录-PCR 克隆了 SARS 病毒的结构蛋白基因,并在大肠杆菌中以包涵体和可溶性两种形式表达了 N 蛋白和 M 蛋白,并初步证实重组 N 蛋白可用于研制新型诊断试剂。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细菌菌株和质粒载体

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 及 *E. coli* DH5 $\alpha$  及表达载体 pET22b 和 pBV222 均为本室保存。

#### 1.2 主要试剂

IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 电泳材料为 Sigma 公司产品、限制酶即反转录-PCR 系统购自 Promega 公司,高保真 PCR 系统购自 Roche 公司,蛋白纯化所用的层析介质均购自 Amersham Pharmacia 公司,1kb DNA Ladder 购自 GIBCO BRL 公司,蛋白电泳低分子量标准购自 Amersham Pharmacia 公司。

#### 1.3 反转录-PCR

根据报道的 SARS 病毒(TOR 株)M、N 基因的序

列,设计如下引物用于基因扩增:PM1 :gaattccatg-gcagacaacggtactatt; PM2 :cgggatccttactgtactagcaaaageaatat; PN1 :cgggaattccatgatgtctgataatggacccecaa; PN2 :cgggatccttatt-gcctgagttgaatcagca。PM1 和 PM2 用于扩增 M 基因, PN1 和 PN2 用于扩增 N 基因。为了方便基因克隆,在 5'引物(PM1 和 PN1)的 5'端含有 *Eco*RI 和 *Nde*I 酶切位点,而在 3'引物(PM2 和 PN2)的 3'末端则含有 *Bam*HI 位点。用 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂从 SARS 病人血液样品(309 医院惠赠)提取总 RNA,用引物 PM2 和 PN2 进行反转录,然后进行 PCR 扩增(94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 90s, 32 循环,最后 72℃ 7min)。PCR 片段用 QIAGEN 的 'Gel Extraction Kit' 纯化后备用。

#### 1.4 基因重组

参考分子克隆第三版<sup>[8]</sup>进行 DNA 酶切、连接、转化,质粒抽提采用 QIAGEN 的微量质粒抽提试剂盒。

#### 1.5 重组蛋白的表达

以 pBV222 为载体时,重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,含重组质粒的大肠杆菌 30℃ 培养 4h 后 42℃ 诱导 4h,离心(4000r/min)收集菌体,超声破碎后离心(14000r/min),上清和重悬后的沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳,分析是可溶性还是以包涵体形式表达。以 pET22b 为载体时,重组质粒转化大肠杆菌 BL21a (DE3),转化获得的大肠杆菌经过夜培养后接种至 LB 培养基,37℃ 振荡培养 5h 后加 IPTG 至终浓度 1mmol/L 诱导 5h 后离心收集菌体,然后进行如上分析。

#### 1.6 重组蛋白的纯化

首先使用离子交换层析进行蛋白纯化。如果蛋白以可溶形式表达,菌体悬于合适体积的缓冲液 A (25mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT)在细菌超声破碎后 14000g 离心 20 min 后直接用于层析;如果蛋白以包涵体形式表达,则将包涵体用 PBS 洗涤一遍后用含 6mol/L 尿素的缓冲液 A (25mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH8.0, 1mmol/L EDTA, 6mol/L 尿素, 1mmol/L DTT)溶解包涵体, 14000g 离心 20 min 后上清用于离子交换纯化。

SP-Sephrose Fast Flow 离子交换介质装填于 1.6cm × 10cm 层析柱,预处理后用 3 个柱体积的缓冲液 A 平衡,样品以 2mL/min 流速上样,然后用缓冲液 A 洗涤至基线;用缓冲液 A 和缓冲液 B (同缓冲液 A,但含 1mol/L NaCl)组成的线性梯度进行洗脱,收集蛋白洗脱峰通过 SDS-PAGE 进行鉴定。

由于 pBV222 载体在 N 端含有 6 个组氨酸,因此可以通过金属螯合层析进行进一步的纯化。其具体步骤参照 Amersham Pharmacia 公司的产品说明。

#### 1.7 重组蛋白的抗原性

经纯化的融合蛋白用包被液(50mmol/L 碳酸缓冲液, pH9.6)稀释至 1 $\mu$ g/mL,包被 96 孔酶联板(Nunc)过夜,用 5% 的小牛血清封闭。100 $\mu$ L 稀释的血清(用含 5% 小牛血清的 PBST 20 倍稀释),室温温育 1h,用 PBST 洗板 3 次后加入稀释的羊抗人 IgG-HRP 酶结合物,室温温育、洗板同前。用 100 $\mu$ L TMB 显色 15min,4mol/L 硫酸终止后测 A<sub>405</sub>。

## 2 结果

### 2.1 SARS 病毒基因的扩增及序列分析

从 SARS 病人血中抽提 RNA,使用引物 pM2 和引物 pN2 进行反转录,随即使用 PM1 + PM2, PN1 + PN2 进行多聚酶链反应(PCR),扩增产物经琼脂糖电泳证实具有特异的扩增片段,M 基因扩增片段为 0.67kb, N 基因扩增片段约为 1.3kb (图 1A)。

扩增片段经电泳纯化后用 *Eco*RI + *Bam*HI 酶切,回收的酶切片段克隆至 pBV222 的相应酶切位点,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,获得的转化子抽提质粒进行酶切鉴定,获得重组质粒 pBV222-M 和 pBV222-N (图 1B)。两质粒分别用载体的 5'和 3'引物进行 DNA 序列分析,结果表明其序列与 SARS 冠状病毒多伦多株(TOR)的 M 基因和 N 基因完全相同(序列分析结果略)。

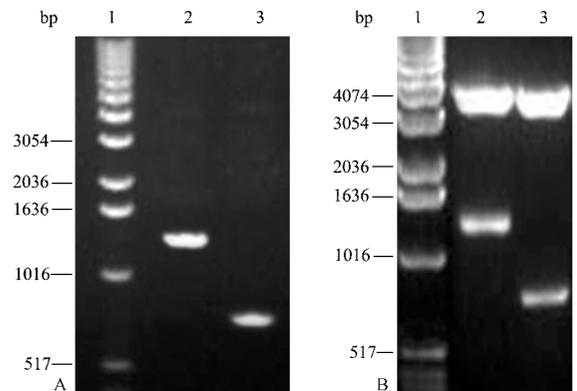


图 1A 通过 RT-PCR 克隆 SARS 病毒的 M 基因和 N 基因

Fig. 1A Clone of N and M gene of SARS by RT-PCR

1. 1kb DNA ladder;

2. N gene amplified by RT-PCR;

3. M gene amplified by RT-PCR

图 1B M 基因和 N 基因克隆至 pBV222 所获质粒 pBV222-N 及 pBV222-M 的酶切鉴定 (*Eco*RI + *Bam*HI)

Fig. 1B Confirmation of recombinant plasmid pBV222-N and pBV222-M by restriction endonuclease *Eco*RI + *Bam*HI digestion

1. 1kb DNA ladder;

2. pBV222-N + *Eco*RI / *Bam*HI;

3. pBV222-M + *Eco*RI / *Bam*HI

### 2.2 M 基因和 N 基因的表达

含重组质粒 pBV222-M 和 pBV222-N 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在 30 $^{\circ}$ C 培养 4h 后 42 $^{\circ}$ C 诱导 4h。取 50 $\mu$ L 菌体,离心(2000g)5min,沉淀用 30 $\mu$ L 1 $\times$  SDS 上样缓冲液悬浮,沸水中煮 5min,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%),考马斯亮蓝染色。结果表明,N 基因在 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动之下可以高效表达,表达的 N 蛋白可占菌体总蛋白的 60% 以上。而 M 基因表达量极低(图 2A)。进一步的分析结果表明,N 基因表达产物主要以包涵体形式存在(约 80%),但也有部分重组蛋白以可溶形式存在(图 2B)。

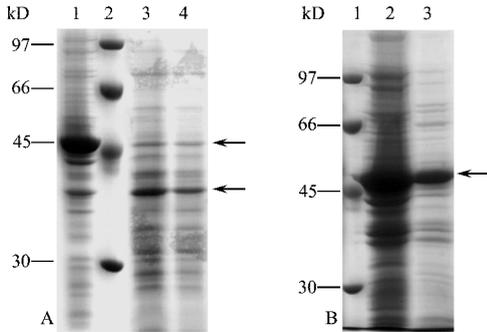


图 2A SARS 病毒 M 及 N 基因在 pBV222 载体中的表达

Fig.2A Expression of pBV222-N and pBV222-M.

1. DH5 $\alpha$ ( pMG222-N );
2. Protein marker ;
3. DH5 $\alpha$ ( pMG222-M );
4. Negative control of DH5 $\alpha$ ( pBV222 )

图 2B N 基因主要以包涵体形式表达

Fig.2B Expression product of N gene existing mainly as inclusion bodies

1. Protein marker ;
2. Inclusion body ;
3. Supernatant

以包涵体形式表达的蛋白容易纯化,可不经复性用作检测抗体诊断试剂盒的包被抗原。但是用作蛋白质质分析等用途时,需要经过较复杂的复性过程。为获得基因的可溶性表达,将质粒 pBV222N、pBV222M 上的 N 基因和 M 基因用 *Nde*I + *Bam*HI 酶切回收,克隆至表达载体 pET22b 的 *Nde*I + *Bam*HI 位点,获得质粒 pET22b-M 和 pET22b-N。质粒经酶切鉴定正确(图 3A)。

重组质粒转化大肠杆菌 BL21 $\alpha$ ( DE3 ), 重组菌 37 $^{\circ}$ C 培养 5h 后,加入 1mmol/L IPTG 诱导 5h,所获培养产物同上鉴定基因表达和包涵体形成情况。结果表明 N 基因和 M 基因在 pET22b 载体中均获得高效表达(重组 N 蛋白和 M 蛋白均可占菌体总蛋白的

60% 以上),且重组蛋白均以可溶形式存在(图 3B)。

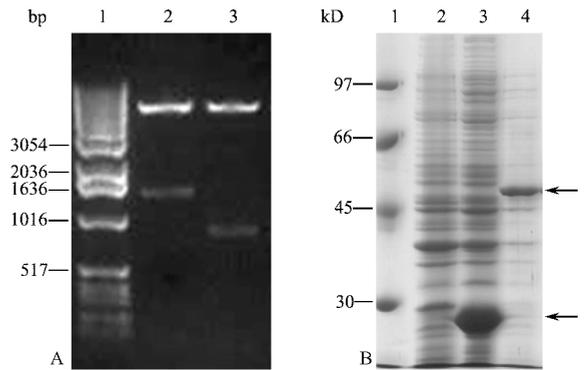


图 3A M 基因和 N 基因克隆至 pET22b 所获质粒 pET22b-N 及 pET22b-M 的酶切鉴定( *Nde* I + *Bam* H I )

Fig.3A Confirmation of recombinant plasmid pET22b-N and pET22b-M by restriction endonuclease *Nde* I + *Bam* H I digestion

1. 1kb DNA ladder ; 2. pET22b-N + *Nde* I / *Bam* H I ;
3. pET22b-M + *Nde* I / *Bam* H I

图 3B SARS 病毒 M 及 N 基因在 pET226 载体中的表达

Fig.3B Expression of pET22b-N and pET22b-M

1. Protein marker ; 2. Negative control of BL21 $\alpha$ ( DE3 ) pET22b ) ;
3. BL21 $\alpha$ ( DE3 ) pET22b-M ) ; 4. BL21 $\alpha$ ( DE3 ) pET22b-N )

### 2.3 重组蛋白的纯化

上述表达 N 基因的重组大肠杆菌进行大规模的培养,获得 1L 左右的细菌培养物,经超声破碎后,pET22b-N 表达的重组 N 蛋白以可溶形式存在,其上清经 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换纯化。用含 0 ~ 1mol/L NaCl 的缓冲液进行梯度洗脱时,蛋白在 0.35 ~ 0.50mol/L 浓度出现洗脱峰(图略)。pBV222-N 表达的重组 N 蛋白以包涵体形式存在,以 6mol/L 尿素溶解其沉淀。同样进行离子交换层析纯化。用含 0 ~ 1mol/L NaCl 的缓冲液进行梯度洗脱时,蛋白在 0.4 ~ 0.55mol/L 浓度出现洗脱峰(图略),经 SDS-PAGE 鉴定为重组 N 蛋白(图 4)。pET22b-M 表达的重组 M 蛋白以可溶形式存在,将其细菌培养物的裂解上清同样进行离子交换层析纯化,结果表明在 NaCl 浓度为 0.2 ~ 0.3mol/L 出现洗脱峰(图略)经 SDS-PAGE 鉴定证实获得电泳纯的重组 M 蛋白(图 4)。

N 蛋白是良好的应用于病毒感染早期诊断的抗原,当用作包被抗原时,少量的大肠杆菌蛋白污染可导致检测试剂的高本底甚至假阳性结果。由于 pBV222 质粒表达的重组蛋白的 N 端带有 6 个组氨酸的标签,可以通过金属螯合层析进行进一步纯化。结果表明,pBV222 质粒表达重组 N 蛋白经金属螯合

层析纯化后,再经扫描分析,其纯度 > 97%。完全可用于组构检测核心抗体的诊断试剂。

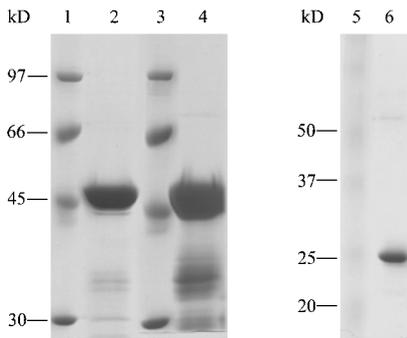


图 4 重组 M N 蛋白经 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换层析纯化

Fig 4 Recombinant protein purified by ion-exchange chromatography

1. Protein marker ;
2. Recombinant N protein expressed by pET22b as soluble form ;
3. Protein marker ;
4. Recombinant N protein expressed by pBV222 as inclusion body ;
5. Protein marker ;
6. Recombinant M protein expressed by pET22b as soluble form

## 2.4 重组蛋白的抗原性

重组蛋白用包被液稀释至  $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $4^\circ\text{C}$  包被过夜,经封闭后加入待检 SARS 病人血清和正常血清。结果表明,100%(6/6)的病人血清中可检出 N 蛋白抗体 ( $OD_{405}$  在 0.6 ~ 2.0),所有正常人血清(20/20)均为阴性 ( $OD_{405} < 0.2$ )。但是在 6 份血清中,均未检测到较强的抗 M 蛋白抗体。

## 3 讨论

本研究在大肠杆菌中高效表达并纯化了 SARS 病毒的核衣壳蛋白和膜蛋白,重组蛋白的表达水平高,经过一步或两步纯化后可获得高纯度的重组蛋白。

由于 S 蛋白、N 蛋白、M 蛋白均有一定的免疫保护活性,因此重组 M 蛋白和 N 蛋白可以用作抗 SARS 亚单位疫苗的组分。当组构 DNA 疫苗、灭活疫苗、载体疫苗时,需要检测 N 蛋白和 M 蛋白的抗体,使用纯化的重组蛋白建立的 ELISA 检测系统可以得到应用。

目前,非典型肺炎的早期诊断仍未较好解决,大量疑似病例在确诊前需要长期隔离。目前使用的通过检测抗体进行诊断的方法中,免疫荧光法适用感染病毒的细胞,ELISA 使用病毒抽提物作为包被抗

原,其来源较困难且具有一定的危险性。在病毒的结构蛋白中,S 蛋白是主要的综合性抗原,其抗体的出现往往预示病人开始恢复。而核心抗原(核衣壳蛋白)具有很强的免疫原性,容易刺激机体在疾病早期产生 IgM 抗体。由于抗 N 蛋白抗体病毒中和活性低,其抗体出现一般预示病毒的活跃复制,因此可能较早期检测病毒感染。

在使用 ELISA 检测抗体时,使用双抗原夹心法具有灵敏度高、非特异反应低、可以同时检出 IgG、IgM 等多种抗体,是检测试剂的发展方向。但用于标记的抗原必须是可溶蛋白,可浓缩到  $1\text{mg}/\text{mL}$  以上。本研究在 pET22b 系统中,高效可溶性表达了病毒 N 蛋白,为建立双抗原夹心法检测抗 SARS 病毒 N 蛋白抗体奠定了基础。相关的进一步研究正在进行中。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1953 - 1966
- [ 2 ] Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escrion N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1967 - 1976
- [ 3 ] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks - Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Gim N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. The genome sequence of the SARS-Associated Coronavirus. *Scienceexpress, published on line*, 1085952, 2003
- [ 4 ] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liflick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen - Rassmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch

us associated with severe acute respiratory syndrome. *Scienceexpress*, published on line ,1085953 2003

- [ 5 ] Saif LJ and Wesley RD , Transmissible gastroenteritis. In : Leman AD , Straw BE , Mengeling WL , D 'Allaire S , Taylor DJ ( eds. ). Diseases of swine , pp.362 – 386 , Wolfe Publishing Ltd , 1992
- [ 6 ] Enjuanes L , Smerdou C , Castilla J. Development of protection against coronavirus induced diseases. A review. *Adv Exp Med Biol* ,

1995 **380** :197 – 211

- [ 7 ] Gebauer F , Posthumus WPA , Corea I , Sune C , Smerdou C , Sanchez CM , Lenstra JA , Melonen RH , Enjuanes L. Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein , *Virology* , 1990 **183** 225 – 238
- [ 8 ] Sambrook J ,Russell D.W. Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001

## Over-expression in *Escherichia coli* and Purification of Nucleocapsid and Membrane Protein of SARS Coronavirus

YI Yan-Ping<sup>1</sup> LI Chu-Fang<sup>1</sup> SHI Yu-Ling<sup>2</sup> LI Lin-Hai<sup>2</sup> LI Ping<sup>1</sup> HUANG Wei<sup>1</sup>

WANG Sheng-Qi<sup>3</sup> MA Qing-Jun<sup>1</sup> CAO Cheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100850 ,China )

<sup>2</sup>( General Hospital of Guangzhou Command of PLA ,Guangzhou 510010 ,China )

<sup>3</sup>( Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850 ,China )

**Abstract** Genes encoding nucleocapsid ( N ) and membrane ( M ) protein of SARS coronavirus were obtained by RT-PCR and were cloned into expression vector pET22b and pBV222. DNA sequencing showed that the genes cloned from a patient in Beijing were identical to the gene sequences from reported Toronto strain. The genes were over-expressed in *E. coli* either as inclusion body or as soluble form. The recombinant proteins were purified by ion-exchange , or ion-exchange followed by metal chelate affinity chromatography. The recombinant N protein was demonstrated highly antigenic and could be employed as antigen to detect SARS antibodies in ELISA system for SARS diagnosis.

**Key words** SARS coronavirus , nucleocapsid protein , membrane protein , expression

Received : 05-22-2003

\* Corresponding author. Tel 86-10-66931810 ;E-mail : caoc@nic.bmi.ac.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>