文章编号:1000-5404(2005)18-1837-04

论著

SARS-CoV S1 蛋白在甲醇营养型酵母中表达及鉴定

何仰东,姜 曼,倪 兵,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 获得保持生物学活性、易于纯化、高产量的严重急性呼吸道综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrom coronavirus, SARS-CoV)S1 蛋白,以便进一步研究 S1 蛋白及其抗体的功能。**方法** 将 SARS-CoV S1 基因重组入酵母表达载体 pMETαA,经过酶切和测序鉴定后,通过电穿孔法将重组质粒 S1-pMETαA 转化入宿主酵母菌株 PMAD11,使其在甲醇的诱导下表达目的蛋白。最后用覆盖分析法对重组转化子初步分析,SDS-PAGE 和 Wesntern blotting 法鉴定目的蛋白的表达和特异性。**结果** 酶切鉴定和测序结果证实了 S1 基因成功地克隆到 pMETαA 载体中;覆盖分析、SDS-PAGE 和免疫印迹法证实 S1 基因得到正确的表达。**结论** 利用酵母表达系统,成功地克隆和表达了 SARS-CoV S1 蛋白,为进一步纯化该蛋白和研究其功能奠定了基础。

关键词: SARS-CoV;S1 蛋白;真核表达系统;甲醇营养型酵母
中图法分类号: R373.1; R392-33;R392.2 **文献标识码**: A

Cloning, expression and identification of SARS-CoV S1 gene in yeast *p. methanolica*

HE Yang-dong, JIANG Man, NI Bing, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain high-yield and easy-purification severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S1 protein with biological activity and to study the activity of S1 protein and its antibody further. Methods SARS-CoV S1 gene was inserted into yeast expression vector pMETαA by ligation reaction. The recombinant plasmid was verified by enzyme digestion and sequencing, followed by being transformed into yeast host strain PMAD11 with electroporation. After induced with methanol, the S1 gene expression was verified with overlay assay and Western blotting. Results The positive clones of S1 gene into pMETαA were approved by restriction enzyme digestion and sequencing. The expression of S1 protein was confirmed subsequently by overlay assay and Western blotting. Conclusion SARS-CoV S1 gene has been cloned and expressed in yeast *p. methanolica*, which can provide experimental data for next study on the activity of this protein and its antibody during SARS-CoV infection.

Key words: SARS-CoV; S1 protein; eukaryotic expression system; yeast *p. methanolica*

SARS-CoV RNA 编码的蛋白中,S 蛋白是与该病毒的致病性,特别是病毒入侵的早期事件密切相关的一种糖蛋白[1]。它通过特异受体介导病毒与靶细胞结合,引起两者膜融合[2,3],并可因其包含重要的中和表位而引起宿主产生中和抗体[4,5]。S 蛋白包括两个结构域:S1 和 S2,其中 S1 位于 N 端,为外周部分,构成 S 蛋白的球状头部,其通过非共价键与跨膜的杆状 S2 片段相连。在病毒感染细胞的初期,外周部分的 S1 负责与宿主细胞上的受体相结合[6~8]。上述线索提示,S1 蛋白是作为阻断 SARS-CoV 与宿主细胞受体结合的良好靶标。以 S1 蛋白为靶标,可以制备出相应的中和抗体;也可基于 S1 蛋白的空间结构,筛选出高效拮抗剂,从而阻断 SARS-CoV 和宿主细胞的结合。因此,本实验拟从灭活 SARS-CoV 中克隆出 S1 蛋白基因,利用甲醇营养型酵母真核表达系统表达 6×His-S1 融合蛋白,然后用 SARS-CoV 感染的恢复期病人血清进行鉴定,为研究 SARS-CoV S1 蛋白功能活性及其免疫学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SARS-CoV S1 基因由本研究所前期制备的 S1-pVAX1 基因疫苗重组质粒获得;甲醇酵母 Pichia methanolica 菌株 PMAD11 和表达载体 pMETαA 购自 Invitrogen 公司;SARS-CoV 感染的康复病人血清由军事医学科学院五所提供。化学发光 Western-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2003CB514108)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2003CB514108)
作者简介:何仰东(1964-),男,江苏省淮安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事分子免疫学方面的研究,现在解放军第255医院检验科。电话:(023)68752236-617
通讯作者:倪 兵,E-mail:nibing@vip.163.com
收稿日期:2004-09-03;修回日期:2005-02-16

blot 试剂盒和蛋白质 Marker 购自美国罗氏公司;培养基 YPAD、STM、YNB、MD、MM 和 BMMY 等按照 Invitrogen 公司操作手册自行配置;其余试剂购自 TaKaRa 公司。

1.2 重组质粒 S1-pMETαA 的构建

1.2.1 目的基因的获得 用 PCR 方法从 S1-pVAX1 重组质粒[9,10]中扩增。上游引物:5′-CGGAATTCTT TATTTTCTTAT-TATTTCTTACTCTCACT-3′,下游引物:5′-TCCCCGCGGTGTCGA-CATGCTCAGCTCCT ATAA-3′,方框中碱基序列分别为 *Eco*R Ⅰ和 *Sac* Ⅱ酶切位点。PCR 参数为 94 ℃,5 min-(94 ℃,45 s;57 ℃,1 min;72 ℃,1 min) ×35 个循环 -72 ℃,10 min。

1.2.2 重组酵母表达质粒的构建 用 *Eco*R Ⅰ/*Sac* Ⅱ内切酶将 S1 目的基因从 S1-pVAX1 重组质粒中切下并连接到载体 pMET αA 中,构建成 S1-pMETαA 酵母表达质粒。酶切鉴定正确后,将阳性克隆送上海申友生物技术公司进行自动测序。

1.3 重组质粒电穿孔法转染酵母细胞 P. methanolica 菌株 PMAD11

1.3.1 制备电穿孔感受态细胞 挑取单克隆酵母菌株 PMAD11 于 50 ml YPAD 培养中培养过夜,然后转种于 200 ml 的 YPAD 中继续培养,当培养物 $D(600)$ 在 0.6 ~ 1.0 时收获酵母细胞。重悬酵母细胞于新鲜配置的 KD 缓冲液中,28 ~ 30 ℃静置 15 min。4 ℃条件下用 STM 缓冲液反复洗涤酵母细胞 3 次,最后用 1 ml 冰冷的 STM 缓冲液重悬酵母细胞,制成电穿孔酵母感受态细胞。

1.3.2 电穿孔转化 将用 Fse I 内切酶线性化并纯化后 1 ~ 3 mg 重组 DNA,加入到 100 ml 新鲜制备的感受态细胞的 EP 管中,冰上孵育 2 min,然后转入预冷的 0.2 mm 电穿孔杯中电穿孔。电穿孔参数为:电压 650 V,电容 50 mF,电阻∞。电穿孔后,立即加入 1 ml 室温 YPAD 并转移到另一个离心管中,28 ~ 30 ℃培养 1 h,1 500 × *g* 室温离心 3 min;用 100 ml × YNB 重悬沉淀,平铺于 MD 平板上 28 ~ 30 ℃培养 3 ~ 4 d 直到克隆出现。

1.4 PCR 鉴定重组转化子

用灭菌 200 ml 枪头,挑取在 MD 平皿培养 2 ~ 4 d 的酵母菌落的一小部分,转移至内含 50 μl PCR 主混合液(10 × 扩增缓冲液,100 ml;20 mmol/L 的 4 种 dNTP 混合液,50 ml;正向引物,1 nmol/L;反向引物,1 nmol/L;H_2O 补足至 1 ml)的扩增反应管中,用枪头吸打 5 次使酵母细胞悬浮于 PCR 主混合液中;将酵母细胞悬浮液在沸水浴中 5 min;样品冷却至室温,离心数秒钟,然后每一个管加入 1 μl 用 10 mmol/L Tris(pH 7.6)稀释至 1 U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶;设置两支对照管。在一支对照管中加入除了模板 DNA 的所有上述试剂;在另一个对照管设置阳性对照管,即加入含有目的基因片段的 S1-pMETαA 重组 DNA 作为模板 DNA。扩增的条件可以如下:变性 94 ℃,1 min;复性 50 ℃,2 min;聚合 72 ℃,2 min,共 30 个循环。抽取每种扩增样品 5 ~ 10 μl,用琼脂糖凝胶电泳来分析扩增结果,判断扩增片段的大小。其中,PCR 引物为表达载体 MCS 位点测序引物,即 AUG1 上游引物:5′-CAATTTACATCTTTATTTATTA-ACG-3′,AUG1 下游引物:5′-GAAGAGAAAAACATTAGTTGGC-3′。

1.5 覆盖分析筛选表达目的蛋白的重组克隆

从 MD 平板影印转化子到 MM 平板上(含 2% 甲醇),然后放置一片合适大小的 NC 膜到 MM 平板上,倒置培养 2 ~ 4 d,每天加 1 ml 100% 甲醇于平板盖子中以诱导目的蛋白表达。诱导结束后将膜置裂解缓冲液中裂解 30 min,用 PBS 漂洗,再用含 0.05% Tween-20 和 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭膜 1 h;加入 SARS 病人康复血清(1∶500),4 ℃过夜。用含 0.05% Tween-20 的 PBS 再洗涤印迹 2 次,0.5% 封闭液洗涤两次后用 HRP 标记的二抗(40 mU/ml)与 NC 膜孵育 0.5 h,最后用化学发光法检测酵母克隆的蛋白质表达。

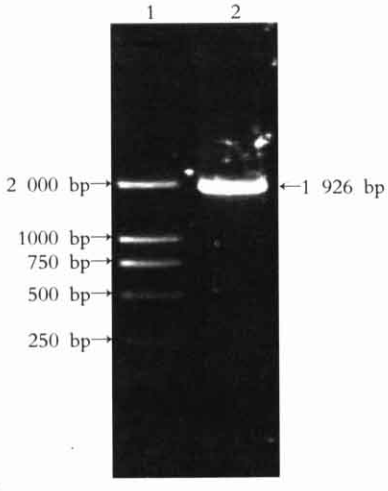
1.6 用甲醇诱导转化子的表达和鉴定

在含有 0.5% 甲醇 BMMY 培养基中进行诱导表达。每天添加甲醇使培养基的甲醇 0.5%,共收集 5 d 的培养基上清和酵母细胞样品,收集后 -80 ℃冻存;用 SARS 病人的多克隆康复血清对收集的样品 Western Blot 分析。对于酵母细胞沉淀样品,取出 500 μl,用 500 μl PBS 重悬,再加等体积的酸洗玻璃珠,涡旋 1 min 后冰上放置 1 min,重复 4 个循环。然后取最高速度离心 10 min 后的上清 50 μl,与 50 μl 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液混合煮沸 10 min,每孔上样 20 μl。SDS-PAGE 电泳后,一块胶用考马斯亮蓝染色,另一块胶进行电转印和化学发光法分析。

2 结果

2.1 S1 基因 PCR 结果

以 S1-pVAX1 重组质粒为模板,PCR 扩增后,0.8% 琼脂糖凝胶(含 SYBR Green Ⅰ染料)电泳后显示出单一条带,且分子量与理论值一致,即 1 926 bp(图 1)。



1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of S1 gene

图 1 S1 基因 PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中的电泳结果

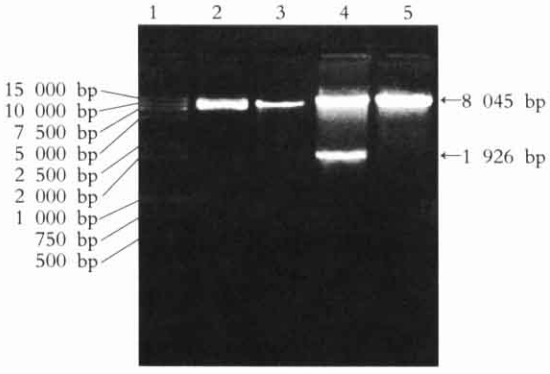
Fig 1 Electrophoregram of S1 gene PCR product on 0.8% agarose ge

2.2 重组 DNA 酶切鉴定

将 S1 基因片段和显性化 pMETαA 酵母表达质粒的连接产物转化大肠杆菌 DH5α 后,抽提阳性克隆重组质粒,并用 *Eco*R Ⅰ和 *Sac* Ⅱ进行双酶切鉴定。电泳图谱显示各 DNA 的片段大小符合理想要求(图 2)。

2.3 重组 DNA 测序结果

双酶切鉴定正确的克隆扩增后,提取重组质粒 S1-pMETαA,送上海申友生物技术公司进一步测序鉴定,结果完全也符合预期要求。



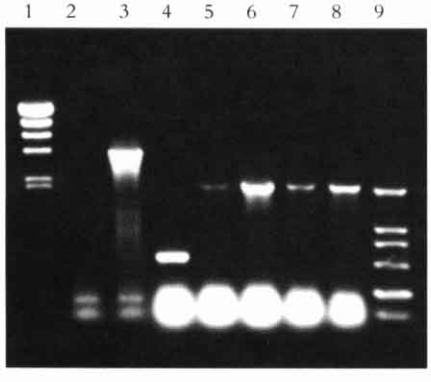
1: DL2000 + 15000 DNA marker; 2 - 4: Double-digested plasmids from different DH5α clones on the plate; 5: Double digested vector pMETαA

图 2　重组质粒 S1-pMETαA 双酶切产物电泳结果

Fig 2　Electrophoregram of restrictive enzyme digested recombinant plasmid S1-pMETαA

2.4　重组转化子 PCR 鉴定

重组 S1-pMETαA 用电穿孔法转化酵母菌株后，为了验证此重组质粒是否整合入酵母基因组中，对酵母转化子进行了 PCR 鉴定。结果证明，重组质粒 S1-pMETαA 已经整合入酵母基因组（图 3）。通过菌落 PCR 方法，从阳性酵母转化克隆中扩增出了 1 926 bp 的目的条带，而阴性对照中未出现此条带（图 3）。



1, 9: DNA ladder (DL2000 + 15000 and DL2000 respectively); 2: Negative control; 3: Recombinant plasmid of S gene (S-pMETαA), used as a positive control; 4: Vector control (pMETαA); 5 - 7: Yeast colonies transformed with S1-pMETαA; 8: Recombinant plasmids control (S1-pMETαA)

图 3　重组酵母的菌落 PCR 结果

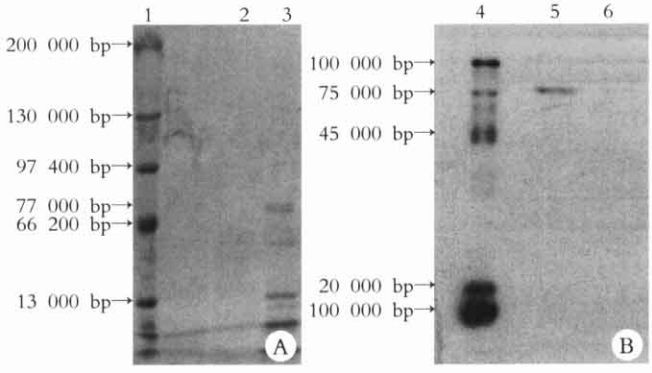
Fig 3　PCR results of recombinant yeast colonies

2.5　目的基因蛋白表达覆盖分析

按前述方法对 PCR 鉴定为阳性的重组酵母克隆进行目的蛋白覆盖分析，同时用空载体 pMETαA 的转化克隆作为阴性对照，结果显示，大部分重组酵母克隆表达了 S1 蛋白。

2.6　诱导表达的目的蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

S1 基因与载体 pMETαA 多克隆位点上游的 α-因子信号肽序列、C-端 V5 表位肽和 6 × His 融合表达。在 α-因子信号肽的引导下，此融合蛋白分泌到培养基上清中。SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色显示，在培养上清中出现了分子量约 77×10^3 的蛋白条带，和 S1 蛋白的理论值大小基本一致（图 4A）；空载体对照组中未出现目的条带。为了更进一步鉴定该蛋白的特异性，我们进行了 Western blot 分析。结果显示，在 X 线片上出现了一条带，且该条带大小约为 77×10^3，和 SDS-PAGE 的结果相印证（图 4B）；而空载体 pMETαA 对照中没有任何条带，说明了所表达蛋白的特异性。



A: SDS-PAGE of culture supernatant; 1: Protein markers; 2: Culture supernatant from vector control (pMETαA); 3: Culture supernatant from recombinant S1-pMETαA; B: Western blotting of culture supernatant; 4: Protein markers; 5: Recombinant S1-pMETαA; 6: Vector pMETαA control

图 4　重组酵母培养上清 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹分析结果

Fig 4　Analysis of culture supernatanf by SDS-PAGE and Western blotting

3　讨论

S 蛋白是 SARS-CoV 主要的抗原蛋白，它是一种跨膜糖蛋白，全长 S 蛋白有 23 个潜在的 N-连接糖基化位点[7]。文献[11]报道 S 蛋白的 S1 结构区域（318 ~ 510 氨基酸残基）是 SARS-CoV 进入被感染的宿主内，与宿主体内细胞上作为 SARS-CoV 融合受体的 ACE2（血管紧张素转换酶 2）结合的主要配体区域。而且有实验证实针对位于 S 蛋白 N 末端的 261-672 氨基酸残基的单克隆抗体，可以有效的中和 SARS-CoV 而阻断表达 S 蛋白细胞与 ACE2 的结合，同时此抗体与 S1 蛋白有很高的结合亲和力[12]。在 Zeng 等[13]的研究中，发现 S 蛋白 S1 和 S2 两个亚单位以及 S1 蛋白的氨基酸残基 18-495 可以帮助激发抗 SARS-CoV 抗体的产生。由此可见，研究针对 SARS-CoV S1 基因蛋白具有重要性。

甲醇营养型酵母表达系统是近年建立的一种真核表达系统。由于它既具有原核表达系统，如常用的大肠杆菌表达系统那样繁殖迅速、费用低廉及操作简便的特点，又具有真核表达系统那样能对表达的蛋白质进行正确的加工、折叠、适度糖基化和利于纯化的特

点,从而用于表达有生物活性的外源蛋白[14]。甲醇酵母表达系统的优点有:①含特有的 AOX(醇氧化酶基因)启动子,可用甲醇严格调控表达。②有完备的发酵方法,可以连续高密度培养,蛋白产量高。③生存能力强,在廉价培养基中生长。④基因表达产物可在胞内积聚,也可分泌到细胞外;分泌的异源蛋白可占所有分泌蛋白的30%以上,有利于下游加工和生产。⑤甲醇酵母的糖基化也以 N-糖基化为主,并以甘露糖为多,但一般长度为8~14个残基,且分泌的糖蛋白不含末端 α-1,3 连接的甘露糖,有利于临床应用[15]。

本实验从灭活 SARS-CoV 中克隆出 S1 蛋白基因,利用酵母真核表达系统表达 SARS-CoV S1 融合蛋白。由于在酵母穿载体 pMETαA 中存在 α 因子信号肽序列,所以 S1 融合蛋白能有效地分泌到培养上清中。而在此融合蛋白的 C 末端连接有 6 × His,所以可以用 Ni-NTA 柱快速、特异地从培养上清中纯化出真核表达的有生物活性的 S1 蛋白,便于对 S1 蛋白的功能活性进一步研究;同时可以用该蛋白免疫动物产生抗体,对此抗体功能进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Schmidt I, Skinner M, Siddell S. Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM [J]. J Gen Virol, 1987, 68 (Pt 1): 47 - 56.

[2] Godet M, Grosclaude J, Delmas B, *et al*. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein [J]. J Virol, 1994, 68(12): 8008 - 8016.

[3] De Groot R J, Van Leen R W, Dalderup M J, *et al*. Stably expressed FIPV peplomer protein induces cell fusion and elicits neutralizing antibodies in mice [J]. Virology, 1989, 171(2): 493 - 502.

[4] Collins A R, Knobler R L, Powell H, *et al*. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell--cell fusion [J]. Virology, 1982, 119(2): 358 - 371.

[5] Fleming J O, Stohlman S A, Harmon R C, *et al*. Antigenic relationships of murine coronaviruses: analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus [J]. Virology, 1983, 131(2): 296 - 307.

[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(5624): 1394 - 1399.

[7] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, *et al*. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs[J]. Science, 2003, 300(5626): 1763 - 1767.

[8] Marra M A, Jones S J, Astell C R, *et al*. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus [J]. Science, 2003, 300(5624): 1399 - 1404.

[9] 黎万玲, 倪 兵, 李晋涛, 等. SARS-CoV S1 蛋白基因克隆及其在 Vero E6 细胞中的表达[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(4): 247 - 249, 257.

[10] 肖 宇, 倪 兵, 李晋涛, 等. SARS-CoV S 蛋白全长基因克隆及其表达的初步研究[J]. 中国临床康复, 2003, 21(7): 2932 - 2933.

[11] Li W, Moore M J, Vasilieva N, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. Nature, 2003, 426(6965): 450 - 454.

[12] Sui J, Li W, Murakami A, *et al*. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(8): 2536 - 2541.

[13] Zeng F, Chow K Y, Hon C C, *et al*. Characterization of humoral responses in mice immunized with plasmid DNAs encoding SARS-CoV spike gene fragments [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 1134 - 1139.

[14] Faber K N, HarderW, Ab G, *et al*. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins[J]. Yeast, 1995, 11(14): 1331 - 1344.

[15] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(8): 905 - 910.

(编辑 陈聪连)

(上接1836页)

血钳钳夹根部,肌瘤剥除后用0/1合成线连续缝合,缝线暂不拉紧,逐步松开退出血管钳,边退边将缝线拉紧;3 采用高频电刀分离包膜,边剥离边电凝止血;4 用可吸收线缝扎双侧子宫动脉上行支[7]。

3.1.3 注意事项 1 术前备足血源;2 解剖层次清楚;3 分层缝合创面[8];4 肌瘤近宫角,切口离宫角要有一定距离;5 如创面出血较多,经处理无效,应作双侧髂内动脉或子宫动脉结扎术[9]。

3.1.4 不宜同时处理情况 1 大型宫颈肌壁间肌瘤;2 合并其它产科严重并发症;3 合并全身脏器功能不全;4 疑有肌瘤恶变者。

3.2 术后处理

加强抗生素及宫缩剂的应用,注意子宫复旧,腹痛及阴道出血,体温及血常规等。

3.3 未行剥除者术后处理

加强随访,定期复查,发现增大及时剥除,减少手术难度。

关键词:剖宫产;子宫肌瘤;处理方式

中图法分类号:R719 文献标识码:B

参考文献:

[1] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 2000: 323.

[2] 连利娟, 林乃琳. 妇科肿瘤学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1996: 359 - 371.

[3] 金志魁. 子宫肌瘤的保守性手术[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1999, 15(5): 267 - 268.

[4] 李大慈. 现代产科治疗学[M]. 广州:广东科技出版社, 1999: 292.

[5] 林 俊. 剖宫产术中对常见妇科肿瘤的处理[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(5): 271 - 272.

(编辑 陈聪连)