文章编号:1000-5404(2006)01-0059-04

论著

SARS冠状病毒N蛋白在酵母中的表达纯化及抗原性分析

郭 旭[1],张 竞[2],李玉珍[1],张 麒[3],李东云[3] (解放军总医院:[1]麻醉科,[2]胸外科,[3]呼吸科,北京 100853)

提 要:目的 研究人SARS冠状病毒核壳N蛋白在*Pichia pastoris*酵母中的表达,获得具有生物学活性的重组N蛋白,并鉴定表达蛋白的抗原性,为下一步的研究奠定基础。**方法** 合成引物扩增SARS冠状病毒N基因,插入含AOX1启动子的*Pichia pastoris*酵母表达载体中,转化酵母宿主菌KM71H、X-33、GS115,筛选阳性转化子,摇瓶培养,用甲醇诱导表达。表达产物经镍离子柱亲和层析纯化后,以抗SARS冠状病毒N蛋白的小鼠单抗、兔多抗及SRAS病人阳性血清鉴定其抗原性。**结果** SDS-PAGE和免疫学分析显示,酵母转化子仅在KM71H、X-33中有Mr约70 000的诱导蛋白,表达产物具有良好的抗原性和特异性。**结论** 在酵母表达系统中,初步实现了SARS冠状病毒核壳N蛋白的有效表达。

关键词: SARS冠状病毒;N蛋白;基因表达;毕赤巴斯德酵母
中图法分类号: R373.9; R392.11; R394.2 **文献标识码:** A

Expression, purification and antigen analysis of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein in *Pichia pastoris* system

GUO Xu[1], ZHANG Jing[2], LI Yu-zhen[1], ZHANG Qi[3], LI Dong-yun[3] ([1]Department of Anaesthesiology, [2]Department of Thoracic Surgery, [3]Department of Respiratory Diseases, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To study the expression of SARS-associated coronavirus nucleocapsid (N) gene in *Pichia pastoris* and to obtain recombinant N protein with good biological activity. **Methods** The gene encoding the full N protein of SARS-CoV was amplified by PCR and cloned into *Pichia pastoris* expression vector pPICZA. The recombinant expression plasmid pPICZA/N was transformed into X-33, KM71H and GS115. The positive insert transformants were screened, cultured and induced by methanol. The recombinant protein was further purified with Ni affinity chromatography. Antigen activity was detected with anti-N monoclonal antibody, polyclonal antibody and sera from SRAS patients. **Results** SDS-PAGE and immunological analysis demonstrated that only *Pichia pastoris* transformants KM71H/pPICZA/N and X-33/pPICZA/N expressed Mr 70 000 fusion protein with special antigenicity. **Conclusion** SARS-CoV N protein expression in *Pichia pastoris* has been achieved, establishing the basis for further study of biological and immunological function of N antigen.

Key words: SARS-associated coronavirus; N protein; gene expression; *Pichia pastoris*

自确定急性呼吸道综合征(SARS)的病原体以来,SARS冠状病毒的基因组学与蛋白质组学研究已取得了较大进展[1-3]。SARS冠状病毒病毒属于有包膜病毒,含单股正链RNA,长约30 kb,具有典型的冠状病毒的基因结构,从5′到3′端依次编码病毒复制所需的复制酶、刺突蛋白(S)、小包膜蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N),与正链RNA结合,两端为较短的非编码区。编码调节病毒复制的非结构蛋白的基因占全基因序列的2/3,并编码2个聚合蛋白(ORF1a和ORF1b)[4]。SARS冠状病毒N蛋白是结构蛋白质区第二大的编码蛋白,长度为423个氨基酸,其处于病毒颗粒的核心部分,在病毒结构中起重要作用。对其他冠状病毒来讲,N蛋白非常保守,具有很强的抗原性,而且在病毒的感染过程中过度表达[5,6],对N蛋白的研究,将有助于对该病毒的更透彻了解。本研究探讨利用酵母系统进行N蛋白的表达和免疫活性的鉴定,并对表达产物进行纯化,为下一步的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 携带SARS冠状病毒N蛋白质粒pET28b(+)/N的*E. coli* JM109由本实验室保存,大肠杆菌-酵母穿梭质粒pPICZA、酵母受体菌*Pichia pastoris* KM71H、X-33、GS115为Invitrogen公司产品。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶、Ex*Taq* DNA聚合酶、T4连接酶购自TaKaRa公司,DNA Marker购自New England Biolabs,预染蛋白分子量标准为Pierce公司产品,ECL显色剂为Pharmacia产品,酵母培养基Pepton、YNB、酵母浸出粉为OXOID产品,酵母DNA提取试剂盒购自Promega公司,PCR反应纯化

作者简介:郭 旭(1978-),男,辽宁省丹东市人,硕士研究生,医师,主要从事临床麻醉和麻醉学基础方面的研究。电话:(010)66937342,E-mail: ZS05055@sohu.com

收稿日期:2005-09-05;修回日期:2005-11-18

试剂盒、质粒提取试剂盒、镍离子亲和层析柱(Ni-NTA)购自Qiagen公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 血清标本来源 所有病人血清标本为确诊SARS病人恢复期血清。健康人血清标本取自来我院体检人员。

1.1.4 抗N蛋白单克隆抗体和兔抗N蛋白血清 均为我院基础研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的扩增 引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。引物P1:5′- CGGAATTCATGTCTGATAATG-GACCCCAATCAA-3′,引入了*Eco*R Ⅰ位点;P2:5′- GGGGTACCT-GCCTGAGTTGAATCAGCAGA-3′,引入*Kpn* Ⅰ位点。以pET28b(+)/N质粒为模板,引物P1、P2扩增N片段用于插入pPICZA载体,PCR扩增条件:94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,共22个循环,最后于72 ℃延伸7 min。

1.2.2 重组质粒的构建 P1和P2引物扩增的PCR产物纯化后,以*Eco*R Ⅰ和*Kpn* Ⅰ双酶切,插入pPICZA的相同位点,连接产物转化*E. coli* JM109,用引物5′AOX1和3′AOX1进行PCR反应快速筛选阳性克隆,并提取质粒进一步酶切鉴定。

1.2.3 酵母表达质粒转化酵母宿主菌 按文献[7]的方法,将酵母菌KM71H、X-33、GS115制备成感受态,取出80 μl与5~10 μg经*Pme* Ⅰ单酶切线性化后酚/氯仿抽提乙醇沉淀的重组表达质粒混合,转至预冷0.2 cm电转杯,冰浴5 min,以Eppendorf电转仪于原核模式,1 500 V、1 pulse、5 ms条件下电转化。立即加入1 ml冰浴山梨醇,转至无菌血清瓶中于30℃静置1 h。将菌液涂布于含有100、500、1 000 μg/ml Zeocin浓度依次递增的YPDS(10 g/L yeast extract, 20 g/L pepton, 20 g/L glucose, 1 mol/L sorbitol, 20 g/L agar)平板上,置30 ℃孵育2~3 d,观察转化子的生长。

1.2.4 酵母转化子的PCR检测 挑取单菌落于3 ml含25 μg/ml Zeocin™的YPD中,30 ℃摇菌过夜,室温4 000×*g*离心5 min,用试剂盒提取酵母DNA。取1 μl提取产物作为模板,以5′AOX1和3′AOX1引物做PCR检测,扩增条件为:94 ℃预变性2 min; 94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共25个循环;72 ℃延伸7 min。

1.2.5 酵母菌株的Mut表型鉴定 用灭菌牙签挑取YPDS筛选平板上的阳性单菌落,先接种于MMH平板,再点种于MDH平板对应位置上,同时设GS115 Albumin为Mut^{s}型对照,GS115/ pPICZ/ lacZ为Mut$^+$型对照。30 ℃孵育,2~3 d后观察Mut表型。

1.2.6 酵母表达菌株的诱导表达 接种KM71H/ pPICZA/N单菌落于50 ml BMGY培养基(含10 g/L yeast extract、20 g/L pepton、100 mmol/L potassium phosphate pH 6.0, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L biotin和10 ml/L glycerol)于30 ℃培养16~18 h。离心、收集菌体,用10 ml BMMY培养基(不含10 ml/L glycerol,而是10 ml/L methanol)重悬培养。X-33/ pPICZA/N和GS115/ pPICZA/N单菌落则先于10 ml BMGY培养基培养,再同上重悬至$D(600)\approx1.0$。均每天取样1 ml,并补加纯甲醇于培养基至终浓度为10 ml/L,诱导表达6 d。取样品,离心收集细胞沉淀,用PBS重悬超声离心后,收集上清,做SDS-PAGE分析。

1.2.7 表达产物ELISA鉴定 用抗N单克隆抗体包被酶联反应板,4 ℃过夜,以2%牛血清白蛋白封闭,4 ℃过夜,加入不同稀释度的超声处理后菌液上清,37 ℃孵育1 h,再加入HRP标记抗N单抗,37 ℃孵育1 h后,TMB显色。

1.2.8 重组蛋白的纯化 参照Qiagen公司说明书,用镍离子亲和层析柱进行亲和层析。酵母N蛋白纯化用变性条件纯化。

1.2.9 Western blot鉴定 10% SDS-PAGE电泳分离N蛋白,电转印至PVDF膜上,转印膜经含10%脱脂牛奶的PBS 4 ℃封闭6 h后,分裁成小条膜,分别加入HRP标记的小鼠抗N蛋白单抗(1∶100稀释)、HRP标记的兔抗N蛋白多抗(1∶500稀释)、SARS病人阳性血清或正常人血清(均1∶100稀释),4 ℃反应过夜。与单抗或兔多抗结合的膜,充分漂洗后,直接用化学发光增强显色法(ECL),X线片曝光显色。而与SARS病人或正常人血清结合的膜,经PBS-Tween洗膜后加入二抗(1∶500稀释的HRP标记羊抗人IgG),37 ℃室温作用1 h,充分漂洗后显色。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建和鉴定

重组质粒构建如图1。PCR扩增的N基因片段长度为1 288 bp,与预计大小相符。将其对应插入pPICZA载体,转化宿主菌,PCR快速筛选阳性克隆,进一步提取重组质粒,酶切鉴定,得到相应的片段(图2)。

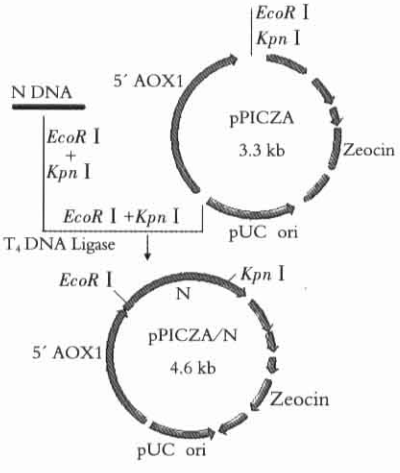
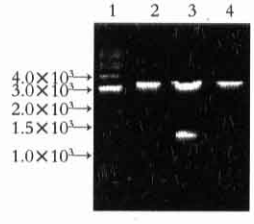


图1 重组质粒pPICZA/N的构建



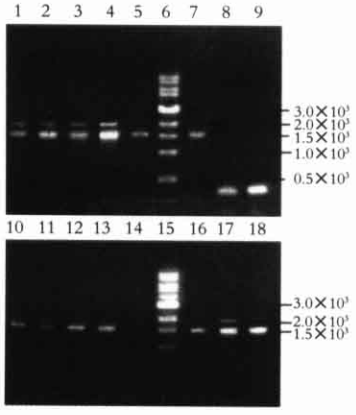
1: DNA标准; 2: *Eco*R Ⅰ消化的pPICZA (3.3 kb); 3: *Eco*R Ⅰ + *Kpn* Ⅰ消化的pPICZA/N (3.3 kb + 1.3 kb); 4: *Eco*R Ⅰ + *Kpn* Ⅰ消化的pPICZA (3.3 kb)

图2 重组质粒pPICZA/N的酶切鉴定

2.2 重组蛋白在酵母中的表达

重组质粒转化酵母,观察YPDS筛选平板,含100 μg/ml及500 μg/ml Zeocin板均见单菌落生长,1 000 μg/ml Zeocin板仅

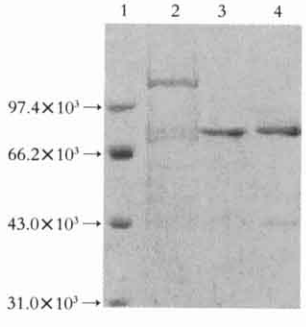
见 GS115/ pPICZA/N 克隆长出。随机挑取克隆，提取菌体 DNA，用 5′ AOX1 和 3′ AOX1 引物做 PCR 检测，得到约 1.6 kb 的特异片段，表明转化子基因组中确实整合有 N 基因，GS115/ pPICZA/N 和 X-33/ pPICZA/N 克隆中还可见 2.2 kb 的特异条带，为 Mut$^+$ 整合（图 3）。



6，15：DNA 标准；1-5：GS115/ pPICZA/N 转化子（1.6 kb or 1.6 kb +2.2 kb）；7：pPICZA/N 质粒（1.6 kb）；8-9：GS115/ pPICZA 转化子（325 bp）；10-14：KM71H/pPICZA/N 转化子（1.6 kb）；16-18：X-33/ pPICZA/N 转化子（1.6 kb or 1.6 kb +2.2 kb）

图 3　转化子的 PCR 检测

经 MMH 和 MDH 平板筛选，挑取 Mut$^+$ 表型的 GS115/ pPICZA/N、X-33/ pPICZA/N 和 Mut^S 的 KM71H/ pPICZA/N 进行小量诱导表达，并设 GS115/pPICZ/ lacZ 酵母菌为表达对照。SDS-PAGE 分析，X-33/ pPICZA/N 和 KM71H/ pPICZA/N 在甲醇诱导的第 2 天，即有表达产物出现，在 Mr 约 74 000 处出现比诱导前浓染的带，随着表达时间的延长，表达量也逐步增高（图未示）；GS115/ pPICZA/N 未见特异诱导条带。取表达好的菌株，进行蛋白纯化，8% SDS-PAGE 结果见图 4。



1：标准；2：从 GS115/pPICZ/lacZ 中纯化的 LacZ；3：从 X-33/ pPICZA/N 中纯化的 N；4：从 KM71H/pPICZA/N 中纯化的 N

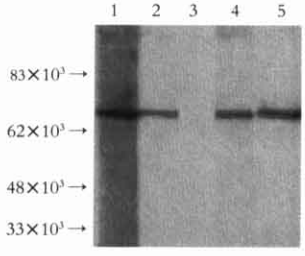
图 4　重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.3 表达产物的 ELISA 鉴定

用夹心 ELISA 法检测超声后的酵母菌液上清，反应结果表明表达产物均具有抗原活性，酵母菌液稀释度达到 1∶100 仍反应阳性。

2.4　Western blot 鉴定结果

Western blot 结果显示，酵母阳性表达菌株 KM71H/pPICZA/N 所表达的蛋白能与鼠抗 N 单抗、兔多抗和病人血清发生特异反应，在 Mr 为 70 000 处出现 1 条特异反应带；与正常血清无反应（图 5）。X-33/ pPICZA/N 表达蛋白也能被单抗特异识别。



1：KM71H/ pPICZA/N 与 anti SARS-CoV N 多克隆抗体反应；2：KM71H/pPICZA/N 与 SARS 患者血清反应；3：KM71H/pPICZA/N 与健康人血清反应；4：KM71H/pPICZA/N 与 anti SARS-CoV N 单克隆抗体反应；5：X-33/pPICZA/N 与 anti SARS-CoV N 单克隆抗体反应

图 5　酵母表达重组蛋白的免疫印迹分析

3　讨论

本实验中采用 pPICZA 载体表达系统，表达蛋白的 N 末端含有 6 个组氨酸，可以与金属 Ni 离子形成螯合物，从而可以用亲和层析法一步进行纯化，蛋白纯度达 90% 以上。由于 6xHis-tag 标签分子量小，不会影响被修饰蛋白质的生理 pH 值，在大部分情况下不会改变被修饰蛋白质的免疫原性、结构和功能，也不会干扰蛋白的分泌，Western blot 结果显示，His-tag 重组 N 蛋白能特异性识别 SARS 病人恢复期血清中的抗体、和特异抗体结合，但不与正常人血清结合，证实其具备良好的免疫原性和抗原特异性，可直接应用于诊断试剂，这为后续研究奠定了基础。

Pichia pastoris 基因表达系统兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加工双重特点，是外源基因表达的理想宿主。外源基因的拷贝数是影响表达量的一个因素。一般来讲，整合的拷贝数越多，表达量越高，但不是绝对的[8]。本实验利用 Zeocin 浓度梯度平板筛选多拷贝转化子，发现多拷贝转化子表达量明显高于单拷贝转化子。最终筛选出 500 μg/ml Zeocin 板 KM71H/pPICZA/N 和 X-33/pPICZA/N 克隆作为表达菌株。GS115 转化子未筛选出有诱导表达带菌株，可能因为在发生单交换整合时，插入 His 位点，并出现染色体突变株与表达盒间基因交换，使表达盒丢失[9]。KM71H 删除了 AOX1 结构基因，外源基因整合得到的均是 Mut^S 表型转化子，酵母以较慢速度生长，有利于产物的折叠，维持产物的空间结构。本研究采用 *Pme* Ⅰ单酶切使表达载体线性化，转化宿主菌，单交

换整合入染色体,筛选出的表达菌株性质稳定,适合高密度培养。本实验中,酵母表达产物大小约为 Mr 70 000,比文献报道的原核中表达蛋白的分子量大,推测乃蛋白在酵母细胞内发生翻译后加工如糖基化所致[10],并使得其较为稳定。实验结果显示,酵母表达产物具有良好的免疫原性。

我们成功的利用酵母表达体系,表达了具有生物学活性的可溶性 N 蛋白,这对于开发其在 SARS 中诊断及防治,深入研究 SARS 冠状病毒将提供有益的帮助。

参考文献:

[1] 姜 曼,王希良,李晋涛,等. SARC-CoVS2 蛋白基因的克隆及其在 Vero 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报,2004,26(1):36-38.

[2] 李 阳,倪 兵,石辛甫,等. RNA 干扰能有效抑制 SARS 相关冠状病毒复制[J]. 第三军医大学学报,2004,26(2):封2.

[3] 何仰东,姜 曼,倪 兵,等. SARC-CoVS1 蛋白在甲醇营养型酵母中表达及鉴定[J]. 第三军医大学学报,2005,27(18):1837-1840.

[4] 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.

[5] KUO L, MASTERS P S. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus[J]. J Virol, 2002, 76(10): 4987-4999.

[6] NARAYANAN K, CHEN C J, MAEDA J, *et al*. Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging *via* viral envelope protein and viral RNA signal[J]. J Virol, 2003, 77(5): 2922-2927.

[7] 周庆玮,谢静莉,辛 利,等. 人纤溶酶原 Kringle 1-5 结构域的表达及活性鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报,2003,35(8):761-767.

[8] DALY R, HEARN M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. J Mol Recognit, 2005, 18(2): 119-138.

[9] SREEKRISHNA K, BRANKAMP R G, KROPP K E, *et al*. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Gene, 1997, 190(1): 55-62.

[10] 王 勇. 毕赤酵母表达外源基因研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2004,32(1):62-66.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)01-0062-01

还原型谷胱甘肽在急性胰腺炎治疗中的作用

何运良,刘素芬,李广波 (河北省职工医学院附属医院普外科,保定 071000)

还原型谷胱甘肽是人体内重要的生物活性分子,在维持组织细胞的生命活动,抗损伤及各器官代谢调节中起着重要的作用。我院从 2002 年 1 月至 2004 年 12 月收治急性胰腺患者 102 例,60 例应用还原型谷胱甘肽(古拉定),疗效明显提高,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

102 例急性胰腺炎病人,重症急性胰腺炎 11 例。随机分 2 组,治疗组 60 例,平均年龄 45.2 岁,对照组 42 例,平均年龄 47.9 岁。两组病人性别、病因及疾病损伤程度无显著差异。

1.2 治疗方法

两组病人均予生长抑素、质子泵阻滞剂、抗生素。治疗组同时给予古拉定 1 800 mg 加入 5% 葡萄糖 250 ml 中静滴,1 次/d,共 7 d。

1.3 观察项目

①观察腹痛、腹胀、恶心等症状,按无、轻度、中度、重度分级;②检验治疗前,治疗 3 d 及 1 周后血淀粉酶,1 周后 ALT、ALP、及 AST 等指标变化。

1.4 疗效判断标准

显效:自觉症状消失或明显好转;血淀粉酶恢复正常;ALT 和 AST 恢复正常。有效:自觉症状好转或稳定不变;血淀粉酶降低 50% 以上;ALT 和 AST 降低 50% 以上。无效:症状及生化指标无改变,达不到以上标准或病情进展。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 临床症状变化

两组患者经过 1 周治疗后,临床症状明显好转,两组比较无明显差异($P>0.05$)。重症胰腺炎者,治疗组症状缓解优于对照组。

2.2 血淀粉酶变化

治疗组 3 d 后血淀粉酶恢复正常者 24 例,显效率为 40%,1 周后显效率为 81.6%。对照组血淀粉酶 3 d 及 1 周后显效率为 18.2% 与 51.3%,有显著差异($P<0.01$)。治疗组有 7 例临床症状缓解,但血淀粉酶未恢复正常,继续给予静滴古拉定 1 800 mg/d,1 周后复查恢复正常。

(下转 77 页)

作者简介:何运良(1967-),男,河北省安新县人,硕士研究生,副主任医师,主要从事普通外科方面的研究,发表论文 15 篇。电话:13932268626,E-mail:hylls@haoyisheng.com.cn

收稿日期:2005-07-18;修回日期:2005-11-02