维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)04-0409-04

重组 SARS-CoV 刺突蛋白基因片段的原核表达及纯化

蒲 丹,宋文鑫,闫 歌,张秉强,唐 霓,王丕龙,郑 建,黄爱龙

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:冠状病毒(SARS-CoV)的刺突蛋白(spike glycoprotein,S 蛋白)是病毒的主要结构蛋白之一,也是重要的病毒抗原,重组 S 蛋白的表达可用于检测病毒感染后血清抗体。方法:根据抗原性预测分析结果,将 S 蛋白中抗原决定簇的编码基因重新拼接成两个新的基因,通过全基因合成方式直接合成至原核表达载体 pET32a(+),转化大肠杆菌 BL21(DE3),以 IPTG 诱导表达,Ni-NTA 试剂盒纯化目的蛋白。结果:SDS-PAGE 证实重组 S 蛋白的表达,并被纯化。结论:重组刺突蛋白的表达及纯化,可做为检测 SARS-CoV 抗体的抗原,有助于进一步开展 SARS-CoV 相关研究。

【关键词】SARS-CoV;刺突蛋白;表达;纯化

【中国图书分类法分类号】R563 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-10-28

Over-expression and purification of recombinant spike protein fragment of SARS coronavirus

PU Dan, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain the spike glycoprotein(S protein) of SARS coronavirus (SARS-Cov) for detection of the corresponding antibody and preparation of diagnostic kits. *Methods*: Genes encoding S protein were picked out to form a new gene and divided into two parts according to the prediction of antigenicty. They were obtained by nucleotide synthesis and were cloned into expression vector pET32a(+) respectively. Proteins then were induced by IPTG and purified through Ni-NTA. *Results*: Target proteins were successfully expressed and purified. *Conclusion*: The recombinant S proteins of SARS-CoV could be of great help in diagnosing the disease and investigating the virus further.

【Key words】SARS coronavirus; Spike protein; Expression; Purification

严重急性呼吸综合症(severe acute respiratory syndrome,SARS)自 2002 年 11 月出现以来,在中国,新加坡、加拿大、越南等地广为流行,尤以我国的北京、香港、广东等地主要疫区,病死率较高并且缺乏有效的治疗手段。研究表明该传染病的病原体是一种以前未知的冠状病毒[1],WHO 命名为 SARS 冠状病毒(Coronavirus)(SARS-CoV)。及时准确的诊断是切断传染源和控制大范围流行最重要的措施。

测序表明 SARS-CoV 为单股正链 RNA 病毒,基因组全长 29,751bp,平均 GC 含量 41%,为具有包膜的单股正链 RNA 病毒,已确定 11 个读码框架[2],其中刺突蛋白(spike protein,S 蛋白)是冠状病毒一种重要的结构蛋白。在某些冠状病毒中,成熟的 S 蛋白插入到病毒包膜内,而蛋白的主体仍然暴露在病毒颗粒的表面,S 蛋白主要负责与宿主细胞表面受体结合和膜膜融合,与病毒的致病性密切相关,具有很强的免疫原性,这些特性使 S 蛋白成为抗体诊断和疫苗研制的良好靶点[3]。

本文利用全基因合成方式及原核表达系统获得大量纯化的 S 蛋白,为 SARS-CoV 的早期诊断以及进一步抗病毒研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒

质粒 pET32a(+)、菌株 BL21(DE3)为本所保存。

作者介绍:蒲 丹(1977-),女,博士生,主要研究方向:细菌和病毒性疾病。

基金项目:国家"863"高科技发展计划项目资助(编号 2002AA215015),重庆市科委项目资助(编号 7673)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 抗原决定簇分析

蛋白抗原决定簇进行在线分析,根据已知的通过实验研究的蛋白上的抗原位置的信息,某些疏水氨基酸如半胱氨酸,亮氨酸和缬氨酸若是暴露在蛋白质的表面则很有可能是抗原位置的一部分。根据 Genbank 中登录的 SARS - CoV 序列(登录号为 AY274119)编码的 S 蛋白基因,输入目的蛋白氨基酸 fasta 序列即可 http://www.bioinfo.org.cn/lmh/antigenicl.htm。

1.3 全基因合成

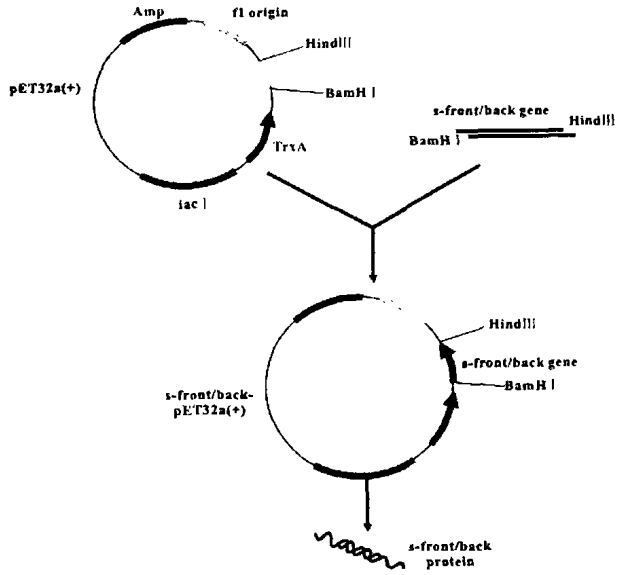


图 1 构建重组质粒及蛋白表达路线

由上海生工生物工程技术公司完成。由于长片段目的基因在原核系统中不易表达,根据抗原性预测分析将重新拼接的 S 蛋白基因分成两部分表达,第一部分 165 个氨基酸,第二部分 202 个氨基酸,在基因上游和下游分别设计 *BamH*Ⅰ、*Hind*Ⅲ酶切位点,并将基因中包含这两种酶切位点的基因以无义读码方式进行突变,通过全基因合成分别将两段基因克隆至原核表达载体 pET32a(+),测序证实序列无误。流程图见图 1。

1.4 诱导表达

重组质粒转化表达菌 BL21(DE3),生长至对数期的细菌以 IPTG 诱导表达,诱导条件为 1mmol/L IPTG,37℃,4.5h,离心收集细菌沉淀,以蛋白上样缓冲液重悬,SDS - PAGE 鉴定蛋白表达。

1.5 纯化目的蛋白

以相同条件大量诱导表达目的蛋白,4℃离心收集细菌沉淀,小量纯化显示目的蛋白以包涵体形式表达。每 5g 湿菌加入 10ml 变性裂解缓冲液,超声破碎至液体清亮,按 Qiagen 公司 Ni - NTA 纯化手册操作纯化目的蛋白,收集洗脱液,以 0.01M,pH7.4 的 PBS 透析过夜,加入 4% 甘露醇,冻干。

2 结 果

2.1 抗原决定簇分析结果

S 蛋白全长 1255 个氨基酸,抗原决定簇在线分析显示有 36 个抗原位点,抗原性最强的 3 个决定簇依次为:1188～1238 位氨基酸,1021～1052 位氨基酸,490～514 位氨基酸。

2.2 新蛋白的拼接

选择抗原性较强的前 12 位共 297 个氨基酸拼接新蛋白,保留各决定簇前后 5 个氨基酸,前 6 个决定簇命名为 s - front,共 165 个氨基酸,495bp,相对分子量为 18000,后 6 个决定簇命名为 s - back,202 个氨基酸,606bp,相对分子量为 21000。两者序列见下图。下划线为抗原决定簇。

2.3 s - front 蛋白的诱导表达

经 IPTG 诱导后 4.5h 后,表达 s - front 的细胞蛋白,应用 SDS - PAGE 电泳结果显示,在分子量约 38kD 处有一明显的蛋白表达带,与预计的 s - front 蛋白分子量一致,并且经纯化,可获得该目的蛋白,其纯度可达 90% 以上(见图 5);而 s - back 蛋白 SDS - PAGE 电泳结果未见明显表达带。

IINNS *TNVVIRACNFELCDNPFFAVSK* KNKDG *FL*
YVYKGYOPIDVVRDLP WERKK *ISNCVADYSVL*
YNST VSATK *LNDLCFSNVYADSFVVKGD* TTTGI
GYOPYRVVVLSFELLNAPATVCGPK PGTNA *SS*
EVAVLYODVNCTDVSTAIHADQLTPAWRI YS
TGN

图 2 s - front 氨基酸序列

维普资讯 http://www.cqvip.com

ATTATTAACAATTCTACTAATGTTGTTATACGAGCATGTAACTTTGAATTGTGTGACAACCCT
TTCTTTGCTGTTTCTAAAAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTATCAACCT
ATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTGGGAGAGAAAAAAAATTTCTAATTGTGTTGCTGATTA
CTCTGTGCTCTACAACTCAACAGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATG
TCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTAC
AGAGTTGTAGTACTTTCTTTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTGTGGACCAAAAC
CTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAACTGCACTGATGTT
TCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGAAAC

图 3　s－front 氨基酸序列

GNNVF *QTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGI*
CASYHTVSLLRST GDSTE *CANLLLQYGSFCTQ*
LNRALSGIA AQKFN *GLTVLPPLLTD* LGQSK *RVDF*
CGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVPS D
NTFV *SGNCDVVIGI* QELGK *YEQYIKWPWYVWLG*
FIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSC
GSCCKF DEDDS

图 4　s－back 氨基酸序列

GGAAACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTT
CTTATGAGTGCGACATTCCTATTGGAGCTGGCATTTGTGCTAGTTACCATACAGTTTCTTTAT
TACGTAGTACTGGAGATTCTACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCA
CACAACTAAATCGTGCACTCTCAGGTATTGCTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTT
GCCACCTCTGCTCACTGATCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTA
CCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTTGTCTTCCTACATGTCACGTATG
TGCCATCCGACAATACATTTGTCTCAGGAAATTGTGATGTCGTTATTGGCATCCAAGAATTG
GGAAAATATGAGCAATATATTAAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACT
AATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCA
AGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCT

图 5　s－back 碱基序列

3　讨　论

冠状病毒共有 3 种血清型，Ⅰ型如人呼吸道冠状病毒(HcoV－229E)、犬冠状病毒(CcoV)等，Ⅱ型包括人呼吸道冠状病毒(HcoV－OC43)、鼠肝炎病毒(MHV)等，Ⅲ型如禽传染性支气管炎病毒(IBV)、火鸡冠状病毒 TcoV)。冠状病毒引起的人类疾病主要有两种，呼吸道感染和肠道感染。SARS－CoV 是区别于以上 3 种的新的冠状病毒，引起严重的肺病疾病，起病急，传播快，病死率高达 9.5%，给人们的健康和生活带来严重威胁。

冠状病毒的 S 蛋白是较大的Ⅰ型膜糖蛋白，主要负责与宿主细胞表面的受体结合以及膜的融合，还包含重要的病毒中和表位。S 蛋白中氨基酸的突变会严重影响致病性和体外病毒对宿主细胞的定向运动[4]。

研究选择 S 蛋白作为诊断的靶点，通过原核表达系统获得大量纯化蛋白。由于 S 蛋白基因片段较长，而且 S 蛋白是一种糖蛋白，这两个因素使 S 蛋白不易在原核系统表达，因此本研究通过抗原性预测分析将 S 蛋白抗原决定簇的编码基因重新拼接成新的蛋白，保留其抗原性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

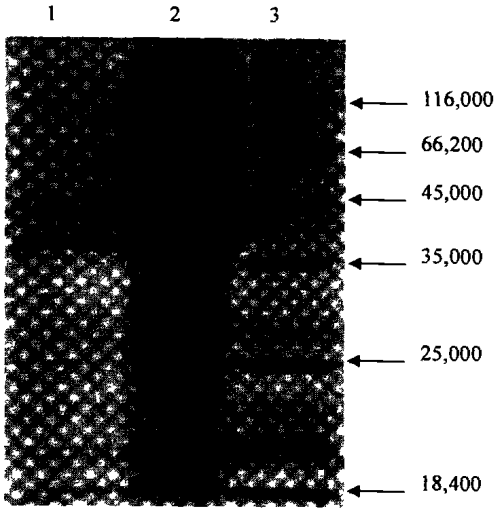


图 6 s－back 碱基序列

1. 纯化 s－front 蛋白；2. 诱导的 s－front 蛋白；3. 分子量标准

s－front 蛋白获得大量表达，相对分子量与预期相符，经 Ni－NTA 纯化后纯度可达 90%，而 s－back 蛋白却未检测到相应明显条带，考虑可能性包括：(1)蛋白虽然表达了，但由于蛋白对宿主菌有一定毒害作用，从而抑制蛋白表达；(2)蛋白表达后被自身或宿主的酶降解。

研究获得大量纯化的保留抗原性的 S 片段，为后续工作，如诊断试剂盒的研制、进一步研究 SARS 病毒打下基础。

参 考 文 献

[1] Thomas G, Dsiazek DVW, Erdman D, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003; 348(20): 1947－1958.

[2] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The Genome Sequence of the SARS－Associated Coronavirus [J]. Science, 2003; 300(5624): 1399－1404.

[3] 张 术，王开宇，郭瀛军，等. SARS 相关冠状病毒 S1 融合蛋白的原核表达与纯化[J]. 第二军医大学学报，2003; 24(7): 704－706.

[4] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003; 300(5624): 1394－1399.