DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.014
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
36 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0036-03

SARS-CoV S2蛋白基因的克隆及其在Vero E6细胞中的表达

姜 曼[1],王希良[2],李晋涛[1],倪 兵[1],黎万玲[1],肖 宇[1],吴玉章[1] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院五所第三研究室,北京 100071)

提 要:目的 克隆人SARS病毒S2蛋白分子的编码序列,并在VeroE6细胞上获得表达。方法 从人SARS病毒cDNA文库中用PCR技术克隆编码SARS病毒S2蛋白的片段。将它插入质粒载体pVAX1中构建重组S2-pVAX1真核表达载体,并对插入片段序列进行测序。采用脂质体法转染VeroE6细胞,用Western blotting检测SARS-CoV S2蛋白的表达情况。结果 用PCR方法扩增出一个1 845 bp的基因片段,并插入pVAX1载体中,成功构建出重组S2表达载体,经测序证实克隆的S2片段阅读框正确完整。将其转染的Vero E6细胞经Western Blotting检测获得一条特异性目的蛋白条带。结论 成功克隆基因并获得表达S2分子的Vero E6细胞系。

关键词:SARS病毒;VeroE6细胞;克隆;真核表达
中图法分类号:R392.11 文献标识码:A

Cloning and expression of SARS-CoV S2 protein gene in Vero E6 cells

JIANG Man[1], WANG Xi-liang[2], LI Jin-tao[1], NI Bing[1], LI Wan-ling[1], XIAO Yu[1], WU Yu-zhang[1]([1]Institute of Immunology, College of Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department 3, Institute 5, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To clone the DNA sequence encoding SARS-CoV S2 protein and to express the protein in Vero E6 cells. Methods SARS coronavirus S2 gene was amplified by PCR from cDNA library of SARS-CoV. The fragment of S2 was inserted into the restrictive site of *Bam*HⅠ and *Sal*Ⅰ of pVAX1 vector and the successful recombinants were identified by double digestion and sequencing. Following transformation into Vero E6 cells by a liposome transfection reagent (DOTAP), S2 protein expression in Vero E6 cells by the recombinant was detected by Western-blotting. Results One DNA fragment with 1 845 bp was amplified by PCR. Double restrictive digestion and sequencing proved that the fragment was cloned into pVAX1 vector correctly with correct ORF and orientation. Recombinant expression vector for S2 was successfully constructed. After transformation into Vero E6 cells, the recombinant could express specific interest protein proven by Western-blotting. Conclusion SARS-CoV S2 gene has been cloned successfully and the Vero E6 cell line expressing S2 has also been obtained.

Key words: SARS-CoV; VeroE6 cell; clone; eukaryotic expression

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome,SARS)又名非典型性肺炎,是近期流行的一种呼吸道传染病。首发病例于2002年11月出现在我国广东地区,并迅速形成流行态势[1]。到2003年5月已波及32个国家和地区。总发病7 548例,死亡573例,病死率为7.6%,其中疫情以中国大陆,中国香港为重。其传染性强,感染率高,严重影响了世界各地的政治经济发展[2]。世界卫生组织于3月15日定名为严重急性呼吸道综合征,4月16日正式宣布SARS的致病原为一种新的冠状病毒,命名为SARS病毒[3]。

目前尚无治疗SARS的特效药物和治疗方法,虽经及时的支持性治疗和对症治疗后,绝大多数病人可以痊愈康复,但其高感染率、高传染性以及病人复发的高度可能性迫切需要特效的药物和疫苗[4]。但防重于治,疫苗的研制显得更为重要而迫切。根据对SARS病毒的基因组测序和以往关于冠状病毒的研究表明,SARS病毒的衣壳蛋白S极有可能是理想的靶抗原,在阻止病毒入侵、中和病毒方面起到关键性作用[5]。

基于上述背景,本研究在已经公布的SARS-CoV基因组序列基础上,通过开放阅读框预测,在真核表达载体pVAX1中克隆了S蛋白下游1 845 bp的序列(这里我们命名为S2蛋白),并利用恢复期病人血清鉴定该蛋白的表达情况,为进一步的基因疫苗研究

作者简介:姜 曼(1963-),女,黑龙江省方正县人,实验师,主要从事分子免疫学及分子生物学方面的研究。电话:(023)68752238-617,E-mail:cqjm-63@sina.com
通信作者:李晋涛,电话:(023)67852236-801,E-mail:jtl1970@yahoo.com
收稿日期:2003-06-16;修回日期:2003-08-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

奠定实验基础。

1　材料与方法

1.1　材料

SARS 病毒 cDNA 及感染 SARS 病人的恢复期血清由军事医学科学院提供。该 cDNA 是用军事医学科学院 P3 实验室病毒感染的 Vero E6 细胞抽提总 RNA(包括细胞 RNA), 然后在 BSL2 条件下进行逆转录反应。考虑到 S 基因很长, 用一种方法可能得不到全长 S 基因, 故使用随机引物和 Poly (dT)n 相结合的方法进行逆转录得到总 cDNA。质粒载体 pVAX1 购自 Invitrogen 公司。核酸酶类购自 Takara 公司。DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、脂质体 DOTAP 及 Western Blotting Kit 盒购自德国 Roche 公司。VeroE6 细胞购自 ATCC 公司。Go a Hu IgG HRP 购自北京中山生物技术有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　引物设计合成　　利用引物设计软件 Primer Premier 5.00 进行设计。上游引物 P3: 5′-cgggatccATGGTCGACACTTCT-TAT-GAGTGC-3′, 下游引物 P4: 5′-cggaattcTTATGTGTAATGTAATTT-GACACC-3′。引物由上海申友生物有限公司合成。

1.2.2　S2-pVAX1 的构建与鉴定　　以 SARS 病毒 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 ℃变性 3 min→94 ℃ 45 s, 57 ℃ 90 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环→72 ℃延伸 10 min。将产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度及分子量后, 切胶回收, 直接与 pVAX1 载体连接, 用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ对 pVAX1 载体及 S2 片段的 PCR 回收产物进行双酶切, 酶切后用 DNA 回收试剂盒回收。按 4∶1 的 S2 与载体的比例混合, 16 ℃做连接反应 16 h, 将连接产物转化 DH5α 宿主菌。经 Kna 平板筛选出阳性克隆后, 用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ分别酶切鉴定, 所获阳性重组子送上海基康公司测序。

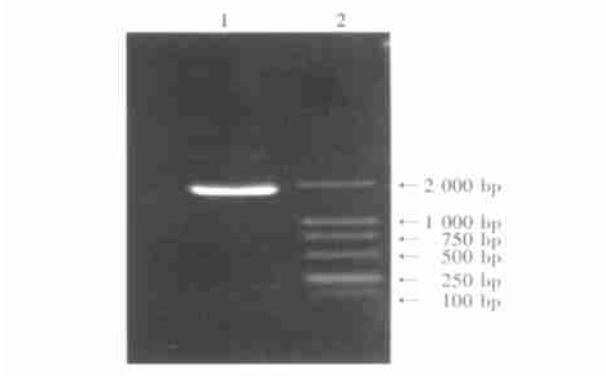
1.2.3　脂质体法转染 Vero E6 细胞　　用质粒抽提试剂盒抽提质粒 S2-pVAX1 备用。VeroE6 细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养至对数生长期, 转染前 1 天传代, 再培养至次日约 40% 满底。按 DOTAP 脂质体转染使用说明书分别将 S2-pVAX1 及 pVAX1 质粒空载体转染至 VeroE6 细胞中, 37 ℃培养 48 h 后收集细胞, 抽提细胞总蛋白进行检测。

1.2.4　Western Blotting 检测 SARS 病毒 S2 片段的表达　　转染后的 Vero E6 细胞与等体积 2× SDS 加样缓冲液混匀后, 用超声粉碎机破碎细胞。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 稳压 100 V 电泳完毕后, 用半干转移电泳仪将蛋白转印至 PVDF 膜上, 以 TBS 溶液洗膜 2 次后将膜在 1% 封闭液中封闭 1 h; 稀释一抗(SARS 病人的恢复期血清)于 0.5% 封闭液中 4 ℃孵育过夜; 用 TBS-T 洗膜 10 min× 2 次, 0.5% 封闭液洗膜 10 min×2 次; 稀释二抗(HRP 标记的羊抗人 IgG)于 0.5% 封闭液中与膜孵育 30 min; TBS-T 洗膜 4 次, 15 min/ 次。配制检测液, 在暗室中 X 线片曝光 30 s, 冲洗胶片。同时, 以转染空载体 pVAX1 的 Vero E6 细胞为对照。

2　结果

2.1　S2 片段的扩增

以 SARS 病毒的 cDNA 文库为模板, 用 PCR 扩增编码的 DNA 序列, 扩增产物的电泳结果显示获得约 1 845 bp 的特异性目的条带。片段大小与预期的理论值完全一致。切胶回收后, 连入 pVAX1 载体。经酶切分析, 对筛选出的阳性重组子进行酶切鉴定, 结果见图 1。



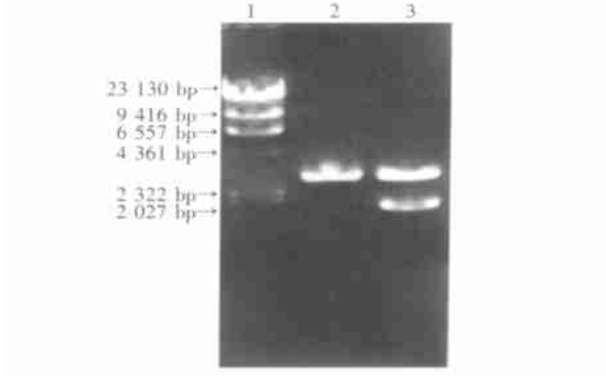
1: PCR product of S2(1 845 bp); 2: DL2000 PCR marker

图 1　PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of PCR product on 0.8% agarose gel

2.2　S2-pVAX1 重组子的鉴定

分别对 PCR 扩增产物及 pVAX1 载体双酶切, 酶切产物经 T4 连接酶连接, 转化 DH5α 后, 在含 Kna 的平板上可见十余个筛选出的阳性重组子菌落生长。挑取阳性重组子菌落, 用 LB 培养基于 37 ℃振摇过夜。扩增后用质粒抽提试剂盒抽提质粒, 用 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ进行酶切鉴定, 筛选出含目的片段的阳性克隆菌株, 并作测序, 结果见图 2。



1: λ/*Hind* Ⅲ marker; 2: Recombinant plasmid; 3: *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ double digested product of recombinant plasmid

图 2　重组质粒 ***Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ** 双酶切在 0.8% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

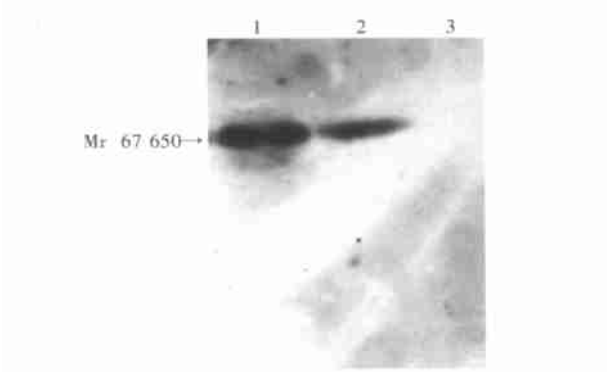
Fig 2　Electrophoresis of the recombinant plasmid digested with *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ on 0.8% agarose gel

2.3　SARS 病毒 S2 蛋白在 Vero E6 细胞中的表达

Western blotting 检测结果表明, 转染后 Vero E6 细胞表达了 SARS 病毒 S2 蛋白分子, 并能与 SARS 病人的恢复期血清发生特异性结合, 从 X 线片上可获得一条分子量

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

为67 650的特异性目的条带(图3)。



1, 2: Vero E6 cells transformed with recombinant plasmid S2/pVAX1; 3: Control Vero E6 cells transformed with non-inserted pVSX1 vector

图3 SARS-CoV S2蛋白 Vero E6 细胞中表达的免疫印迹

Fig 3 Western blot analysis of SARS-CoV S2 protein expressed in Vero E6 cells

3 讨论

SARS-CoV 是一种新型冠状病毒, 为 ssRNA(+)病毒。在电镜下, 病毒颗粒呈不规则形, 直径约为 60~220 nm。颗粒中心负染在电镜下呈不定形态, 核壳体呈疏松状态[6]。有关 SARS 的基因组测序和结构预测表明: SARS 包膜上有两种糖蛋白: 一种为S 蛋白, 又叫刺突糖蛋白(spike glycoprotein), 是主要的抗原, 与受体结合, 使细胞融合。另一种为 M 蛋白, 跨膜, 参与包膜的形成。S 蛋白是呈"棒棒糖"状的膜蛋白, 它由两个结构域组成, 靠近 N 端的部分形成一个球状的结构域, 靠近C 端的部分形成一个穿膜的棒状结构, 编码约 1 255 个氨基酸的表面糖蛋白前体[7]。对已知的冠状病毒的研究已经证明, S 蛋白与病毒侵入细胞的过程密切相关, 提示 S 蛋白可能是病毒诱发机体免疫系统生成抗体, 及发生细胞毒性的T 细胞免疫反应的主要抗原蛋白。S 蛋白前体在宿主细胞质中合成以后会被切成两个部分 S1 和S2。S1 形成成熟蛋白的球状部分, S2 形成成熟蛋白的棒状部分。S1 和 S2 之间通过分子间作用力相互结合。S2 的穿膜部分把整个 S 蛋白固定在病毒外壳膜上[8]。鉴于完整的 S 基因较大, 从病毒基因组直接扩增有一定的难度, 而 S1 和 S2 均有抗原作用。因此, 本研究针对 S2 设计 PCR 引物, 以随机引物和 polydTn 逆转录的 cDNA 混合物为模板, 成功扩增并克隆了 S2 基因。进一步构建到真核表达载体 pVAX1, 转染 VeroE6 细胞得到正确表达, 为下一步基因疫苗研究奠定了实验基础。由此可见, 选用 S2 蛋白作为疫苗的靶抗原或许有望研制特异、有效的 SARS 疫苗, 为 SARS 的预防提供一种有效方法。

参考文献:

[1] Nie Q H, Luo X D, Zhang JZ, *et al*. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. World J Gastroenterol[J], 2003, 9(8): 1635-1645.

[2] 姚 [illegible]. SARS 相关冠状病毒的研究进展[J]. 南京医科大学学报, 2003, 23(4). 295-298.

[3] Chen H I, Kao S J, Wang D, *et al*. Acute respiratory distress syndrome[J]. J Biomed Sci, 2003, 10(6 Pt 1): 588-592.

[4] Demmler G J, Ligon B L. Severe acute respiratory syndrome (SARS): a review of the history, epidemiology, prevention, and concerns for the future. Semin Pediatr Infect Dis[J], 2003, 14(3): 240-244.

[5] Hawkey P M, Bhagani S, Gillespie S H. Severe acute respiratory syndrome (SARS): breath-taking progress[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 8): 609-613.

[6] Konrad Stadler, Vega Masignani, Markus Eickmann, *et al*. SARS-beginning to understand a new virus[J]. Nature reviews microbiology, 2003, 1(3): 209-218.

[7] Schelegle E S, Green J F. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors[J]. Respir Physiol, 2001, 125(1-2): 17-31.

[8] Gallagher T M, Buchmeier M J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis[J]. Virology, 2001, 20, 279(2): 371-3744.

(编辑 郭建秀)

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中, 引用英文文献的比例很高, 但有不少作者将英、美人的姓名搞错, 以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是: 名-名-姓, "名"可以有 1 个、2 个或 3 个; 但"姓"只有 1 个。因此, 从书籍或期刊中的姓名转录到文献时, 要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的; "名"可以缩写, 用第一个字母大写, 不用缩写点。数据库在著录作者姓名时, 已经调整为姓-名-名, 可照录。

例如: John Quincy Public 写为 Public J Q。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net