

SARS 病毒核蛋白基因的克隆及其表达研究

朱函坪, 陆群英, 卢亦愚, 姚莘莘, 徐芳, 葛琼, 翁景清,

严菊英, 龚黎明, 施雯, 赵芝雅, 朱智勇

(浙江省疾病预防控制中心病毒研究所, 浙江杭州, 310009)

Cloning and Expression of Nucleocapsid Protein Gene of

SARS Associated Coronavirus

ZHU Han-ping, LU Qun-ying, LU Yi-yu, YAO Ping-ping, XU Fang, GE Qong, WENG Jing-qing, YAN Ju-ying,
GONG Li-ming, SHI Wen, ZHAO Zhi-ya, ZHU Zhi-yong

(Institute for Virus Disease Research, Zhejiang Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310009, China)

Abstract: Nucleocapsid gene of SARS-associated coronavirus(SARS-CoV) was obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction from a patient suffered from severe acute respiratory syndrome (SARS) from Beijing, subsequently cloned into pUCm-T vector. The sequence of positive recombinants was determined by the method of dideoxy chain termination, which revealed that the nucleocapsid gene segment is 1269 nucleotide in length with an open reading frame encoding a protein of 422 amino acids. Nucleocapsid gene was subcloned into the prokaryotic vector pET28a. The recombinant plasmid pET28a-SN was transformed into host cell BL21(DE3). After inducing by IPTG, about 50kD protein was expressed and the expression level was about 45%. Western-blot analysis demonstrated that the recombinant proteins reacted with SARS positive sera but not with normal sera tested. SARS nucleocapsid protein expressed by the *E.coli* system offer a safe source of specific antigen for diagnostic purposes.

Key word: SARS-associated coronavirus(SARS-CoV); Nucleocapsid gene; Sequence analysis; Protein expression; Antigen

摘要: 从一例输入性传染性非典型肺炎病人血清中提取病毒 RNA, 通过 RT-PCR 方法扩增出 SARS 病毒核蛋白基因片段, 克隆入质粒载体 pUCm-T 后, 进行核苷酸序列的测定及分析, 与已公布的 SARS 病毒基因序列进行比较, 证实为 SARS 冠状病毒核蛋白基因。为了解该病毒核蛋白的抗原特性, 将核蛋白基因插入表达载体, 构建重组质粒 pET28a-SN, 转导大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 加 IPTG 诱导表达。产物经 SDS-PAGE 电泳分析, 表达出相对分子量约为 50kDa 的蛋白, 占整个菌体的 45% 左右。Western-blot 分析表明, 表达产物仅与 SARS 阳性病人血清起反应, 而与正常血清不起反应。间接 ELISA 免疫检测, 抗原滴度达 1:12500。表明表达的核蛋白为 SARS 特异性抗原, 这为 SARS 病毒的诊断试剂的研制提供了方便而安全的抗原来源。

关键词: SARS 病毒 (SARS-associated coronavirus, SARS-CoV); 核蛋白基因; 序列分析; 表达; 抗原性

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0451-03

自从浙江省 4 月中旬传入第一例输入性严重急性呼吸综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 临床诊断病例后, 我中心即启动 P3 生物安

全实验室, 开展 SARS 病原学的研究。SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 为单股正链 RNA 病毒, 基因组 RNA 有近 30kb, 主要编码 RNA 聚合酶、S 蛋白、

收稿日期: 2003-07-23, 修回日期: 2003-08-08

作者简介: 朱函坪 (1964-), 男, 浙江黄岩籍, 高级工程师, 目前从事病毒性疾病分子生物学方面的研究。

M蛋白及N蛋白(核蛋白)^[1,2],本研究从一例SARS病人血清中克隆到SARS核蛋白基因,并对它进行核苷酸序列测定及蛋白表达,这为进一步开展诊断试剂的研制,提供了大量方便、安全的SARS特异性抗原,现将有关情况报道如下。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器及试剂

PCR扩增仪为PE公司产品,蛋白印迹装置为BIO-RAD公司产品。RNA提取试剂购自Invitrogen公司,逆转录酶、Taq酶、限制性内切酶、Agrose胶提取试剂盒及质粒载体pUCm-T购自上海生工公司。碱性磷酸酶标记的羊抗人IgG酶标抗体,由本中心艾性科提供。表达质粒pET28a及宿主菌BL21(DE3)为本所保存。

1.2 RNA的提取

按Invitrogen公司的总RNA提取试剂液操作说明进行病毒RNA的提取,溶于DEPC水备用。

1.3 反转录与PCR扩增

根据已公布的SARS基因序列设计一对引物,由上海生工公司合成,上游引物及下游引物均加入SalI酶切位点。

上游引物 P1: 5'-cagtcgacttaaaatgtctgataatg-3'

SalI

下游引物 P2: 5'-cagtcgacttatgcttgagttgaatc-3'

SalI

在引物P1,和M-MLV反转录酶作用下合成cDNA,然后用P1、P2进行PCR扩增,条件为94℃60s,52℃60s,72℃60s,30个循环,72℃保温10min。

1.4 目的片段的克隆和筛选

用Agrose胶提取试剂盒提取目的片段,克隆入pUCm-T质粒载体,转化E.coli DH5a,经含氨苄青霉素、X-gal和IPTG的培养基筛选,提取质粒,酶切鉴定重组子。

1.5 核苷酸序列测定

将阳性重组子pUCm-SN,在ABI自动测序仪从正反两个方向分别进行测序,得到的全长核苷酸序列,与GenBank SARS冠状病毒核苷酸序列进行比较。

1.6 表达质粒的构建

用SalI双酶切质粒pUCm-NS和表达质粒pET28a,回收核蛋白基因片段与pET28a连接,产物转化BL21(DE3)受体菌,PCR筛选阳性克隆菌,XhoI酶切筛选出正向插入的阳性菌。

1.7 核蛋白的表达

阳性表达菌接种于5mL LB(Kan)细菌培养基中,37℃摇床过夜,按1:100比例转种100mL LB(Kan)细菌培养基中,在适当时候加入IPTG诱导蛋白表达,吸取10mL菌液,离心收集菌液,沉淀重悬于去离子水中,超声破碎6min,12000r/min离心10min,收集上清,进行ELISA检测表达情况。

1.8 表达产物的抗原测定

将上述方法制备的上清在凹孔板上用Tris稀释液按1:5进行稀释,37℃包被2h,洗板,加SARS阳性血清,37℃反应1h,洗板5次,加羊抗人酶标抗体,37℃反应1h,洗板,加显示液,观察结果。

1.9 SDS-PAGE电泳及紫外薄层扫描分析

离心收集表达菌,加入100μL样品缓冲液(40mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 10%甘油, 2%SDS, 5%巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝),煮沸5min。上样,采用10%SDS-PAGE电泳,凝胶经考马亮兰R-250染色,脱色至背景清晰为止,利用紫外薄层扫描分析目的蛋白的表达水平。

1.10 Western-blot分析

样品经SDS-PAGE电泳后,转移至硝酸纤维素膜,4℃封闭过夜,一份加SARS阳性病人血清(1:500),另一份加正常人血清(1:500),37℃反应1h,分别加二抗(羊抗人酶标IgG抗体),37℃反应1h,漂洗后,最后加入显色剂,避光显色,观察着色带。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

经琼脂糖凝胶电泳检查PCR扩增产物,以λDNA Marker(EcoRI/HindIII)为标准,产物分子量在1.2kb左右,与期望的扩增片段相符,将目的基因克隆入质粒载体,并进行酶切鉴定,结果与期望一致,初步判定为特异性扩增(图1)。

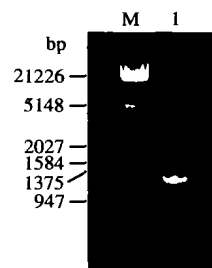


图1 SARS核蛋白基因PCR扩增条带
Fig.1 PCR amplification SARS nucleocapsid gene
M, DNA marker; 1, PCR product

2.2 SARS 核蛋白基因序列及编码氨基酸

经核苷酸序列测定, 证实所扩增的产物为 SARS 冠状病毒核蛋白基因, 序列已登录 GenBank, 登录号为 AY360146。测序结果表明 SARS 核蛋白基因由 1 269 个核苷酸组成, 只有一个开放读码框架, 编码 422 个氨基酸, 其碱基组成为 A(31.6%), G(22.1%), C(26.3%), T(20.0%)。

2.3 与已知 SARS 病毒核苷酸序列及编码氨基酸序列的同源性比较

将 SARS 病毒核苷酸序列与已公布的 8 株 (CUHK-W1, SIN2500, TOR2, URBANI, BJ01, GZ01, TW1, HKU-39849) SARS 病毒比较, 核苷酸同源性为 100%, 仅与 CUHK-SU10 株存在一个碱基的差别, 在 378 处由 G 变成 T, 氨基酸由 G 变成 C。

2.4 重组质粒在大肠杆菌中的表达

携有 SARS 核蛋白基因的重组表达质粒 pET28a-SN 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 培养诱导后, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 显示出一条浓的表达带, 其相对分子量与核蛋白分子量基本一致, 为 50kDa 左右。紫外薄层扫描显示目的蛋白的表达量占菌体细胞总蛋白量的 45% 左右, 表达效率极高 (图 2A)。

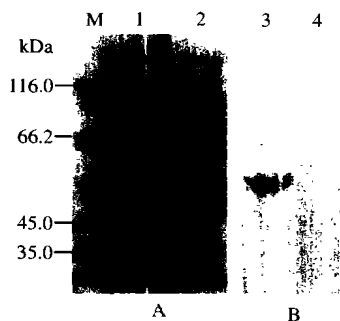


图 2 SDS-PAGE (A) 及 Western blotting (B) 检测
Fig.2 Expression analysis by SDS-PAGE(A) and Western blot(B)
M, Protein marker; lane 1. Induced total lysates of pET28a-SN; 2, Total lysates of pET28a; 3, SARS patients serum; 4, Negative serum.

2.5 Western blotting 检测

经 Western blotting 检测, 表达的产物仅与 SARS 阳性病人血清起反应, 产生一条清晰的着色带, 而与 5 份正常人血清和 5 份出血热病人血清不发生反应 (图 2B), 表明表达的蛋白为 SARS 病毒特异性的核蛋白。

2.6 表达产物间接 ELISA 检测

收集经 IPTG 诱导的菌体, 裂解, 包被酶标板,

用间接 ELISA 检测其抗原滴度, 为 1:12500。

3 讨论

严重急性呼吸综合征最早于 2002 年 11 月发现于我国广东省, 后来在世界近 30 个国家和地区均出现本病的流行, 其中我国发病人数最多, 该病传染性强, 流行速度快, 给我国政治、经济造成重大的损失。后经世界多个实验室证实, 一种以前未知的冠状病毒为本病的病原, 称 SARS 冠状病毒^[3-6]。

核蛋白处于病毒颗粒核心部分, 以病毒基因组 RNA 相结合的形式存在, 有稳定 RNA 的功能, 在病毒的复制及组装中起重要作用^[7]。SARS 冠状病毒核蛋白基因序列与其他冠状病毒核蛋白基因序列有很大的不同, 而从目前已公布的多株 SARS 冠状病毒基因序列可知, SARS 核蛋白基因序列基本相同, 故该序列非常保守, 用它来作为诊断抗原, 有其理论基础。

本研究选择 SARS 病毒相对保守的核蛋白基因进行扩增和克隆, 并在大肠杆菌中进行高效地表达。通过 Western-blot 与间接 ELISA 方法, 证实表达核蛋白能与 SARS 阳性血清起特异性反应, 表明表达的核蛋白具备与 SARS 阳性血清起特异性反应的抗原决定簇, 且抗原性较强, 这为进一步开发诊断试剂, 提供了既方便又安全的抗原来源。

参考文献

- [1] Marra M, Jones S, Astel C, *et al.* The Genome sequence of the SARS associated coronavirus[J]. *Science* 300: 1399-1404.
- [2] Rota P, Oberste S, Monroe S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *Science* 300: 1394-1399.
- [3] Lee N, Hui D, Wu A, *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1986-1994.
- [4] Drosten C, Günther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med* 2003, 348: 1967-1976.
- [5] Poutanen S M, Low D E, Henry B, *et al.* Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada[J]. *N Engl J Med* 2003, 348: 1995-2005.
- [6] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med* 2003, 348: 1953-1966.
- [7] Lei S, Zhang Q P, Rui W, *et al.* Searching the possible binding site of the SARS N protein and SARS RNA[J]. *CMBI*, May 9, 2003.