

SARS 冠状病毒 M 基因的克隆及其表达 *

晏辉钧¹, 赵卫², 方丹云¹, 周经姣¹, 龙北国², 张文炳², 郭辉玉¹, 江丽芳^{1**}

(1. 中山大学基础医学院微生物学教研室, 广东广州, 510080; 2. 南方医科大学热带卫生学系微生物学教研室, 广东广州, 510515)

Cloning and Expression of SARS Coronavirus M Gene *

YAN Hui-jun¹, ZHAO Wei², FANG Dan-yun¹, ZHANG Wen-bing², LONG Bei-guo²,
ZHOU Jing-jiao¹, GUO Hui-yu¹, JIANG Li-fang^{1**}

(1. Department of Microbiology, Preclinic Medical school, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Microbiology, Nanfang Medical University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The full-length gene of membrane protein (M) of SARS coronavirus (SARS-CoV) was cloned using RT-PCR from the Vero-E6 cells infected with SARS-CoV (GD322 strain) and inserted into the multi-cloning site of the pPICZ B vector. The recombinant plasmid was transformed into *P. pastoris* strain X-33 by electroporation and selected by Zeocin. Mut phenotype determination was performed on the yeast transformants and then expression of Mut⁺ colonies were induced by methanol. The expressed products were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Secreted expression was performed by screening Mut⁺ colonies in the yeast transformants. The molecular mass of the recombinant M protein was approximately 65 kDa and 42 kDa and secreted into culture medium when induced with methanol. The expressed protein was able to react with SARS convalescence polyclonal antibody.

Key words: SARS coronavirus (SARS-CoV); M gene; Clone; *Pichia pastoris*; Expression

摘要:从 SARS 冠状病毒 (GD322 株) 组织培养上清中提取 RNA, 进行 RT-PCR 扩增其 M 基因并克隆到巴氏毕赤酵母表达载体 pPICZ B, 电穿孔法将重组体整合入酵母菌 *P. pastoris*, 经抗生素 Zeocin 筛选产生的转化子进行表型鉴定, 取 Mut⁺ 菌用甲醇诱导表达, SDS-PAGE 检测其表达产物。Mut⁺ 酵母转化菌经甲醇诱导可分泌表达约 65 kDa 和 42 kDa 的蛋白质, 与 SARS 恢复期病人血清的免疫印迹证实它们为特异的重组 M 蛋白质, 且获得的重组 M 蛋白质具有免疫反应性。

关键词: SARS 冠状病毒; M 基因; 克隆; 巴氏毕赤酵母; 表达

中图分类号: R 373.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0001-04

严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS), 又称传染性非典型肺炎, 是一种由 SARS 冠状病毒 (SARS Coronavirus, SARS-CoV) 引起的新型传染病^[1]。SARS-CoV 是一种新型冠状病毒, 病毒核酸为单股正链 RNA, 病毒于 2003 年 4 月 12 日由加拿大科学家首先测得其全基因序列长度为 29 376 bp, 其基因组与目前已知的三型冠状病毒均有较大差异。Ksiazek^[1] 等推测基因组 26 398 ~ 27 063 位编码一全长 221 氨基酸的膜蛋

白 (Membrane glycoprotein, 简称 M 蛋白)。冠状病毒 M 蛋白是一种跨膜蛋白, 在病毒装配、成熟和释放中起重要作用, 同时 M 蛋白具有一定的免疫原性^[2]。本研究从本实验室分离的一株 SARS-CoV (GD322) 中扩增出 SARS-CoV 全长 M 基因片段, 成功克隆并转染至巴氏毕赤酵母, 并分泌表达出 SARS-CoV M 蛋白。

1 材料与方法

收稿日期: 2004-06-14, 修回日期: 2004-07-15

* 基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30340013); 广东省科技攻关项目 (编号: 532014202028)

作者简介: 晏辉钧 (1968-), 男, 湖南省籍, 讲师, 在职博士生, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 江丽芳 (1953-), 女, 广东省籍, 教授。Corresponding author. Tel: 020-87332160, E-mail: jianglf@gzsums.edu.cn

1.1 实验材料

SARS 冠状病毒 (GD322 株)^[3], 本室分离培养并保存。Vero-E6 细胞、大肠杆菌 DH5 为本实验室保存。提取病毒 RNA 试剂盒用 Omega Bio-tek 的 E. Z. N. A Hp Viral RNA Kit, AMV 逆转录酶、RNasin、T4 DNA 连接酶、内切酶 *KpnI*、*XbaI* 均为 Promega 产品, Taq 聚合酶和 dNTP 购自华美生物工程公司, 质粒小量提取试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒均购自上海生物工程有限公司, 载体 pPICZ B、酵母菌 *Pichia pastoris* X-33、抗生素 Zeocin 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 引物

引物由上海博亚生物工程有限公司合成。上游引物: 5'-CggtagcATTGGCAGACAACGGTA-3', 小写斜体为内切酶 *KpnI* 序列, 对应于 TOR2 株 26 398 ~ 26 413 nt, 下游引物: 5'-GCTctagaTACTGTACTAGCAAAGC-3', 小写斜体为内切酶 *XbaI* 序列, 互补于 TOR2 株 27 062 ~ 27 046 nt。扩增片段长度 (包括内切酶位点) 共 679 bp。

1.3 标本处理及 RNA 的提取

SARS-CoV (GD322) 感染 Vero-E6, 待 CPE 达到 ++ ~ +++ 时, 收集病毒培养上清, 使用 Omega Bio-tek 的 E. Z. N. A Hp Viral RNA Kit 提取 RNA。

1.4 RT-PCR

使用 Eppendorf 的 Autorisierter Thermocycler, 进行 RT-PCR。

按常规逆转录法得到 cDNA 后进行 PCR 扩增, 94 ° 变性 5 min 后加入 Taq 聚合酶进行 PCR, 其反应条件为 RT: 37 °, 60 min; 95 °, 3 min。PCR: 94 °, 30 s, 60 °, 30 s (drop 1 °/cycle); 72 °, 1 min。共 10 次循环。94 °, 30 s; 55 °, 30 s; 72 °, 1 min。共 25 次循环。72 °, 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 PCR 产物的克隆测序

质粒酶切、连接、转化等技术均参考文献^[4]进行, *KpnI*/*XbaI* 双酶切 PCR 产物与 pPICZ B, 分别回收纯化, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5, 用 Zeocin 初筛, 并对获得的克隆进行 *KpnI*/*XbaI* 双酶切初步鉴定和 PCR 鉴定, 最后, 用通用引物 AOX1 测序。

1.6 序列分析

对所测得序列用 Blast 同源性分析。收集 GenBank 中 SARS 冠状病毒的核苷酸序列, 利用 DNASTAR 软件包中 MEGALIGN 程序对测得序

列与收集序列进行同源比较。

1.7 电穿孔转化

按 Invitrogen 公司提供的操作指南制备新鲜的感受态酵母菌, 在预冷的电转化杯 (Bio-Rad) 加入酵母感受态细胞与线性化的重组质粒 DNA, 用 GenePulser 电击穿孔后立刻加入 1 mol/L 山梨醇 1 mL, 30 ° 培养 2 h。

1.8 转化子筛选鉴定

将转化液平铺 YPDS 平板 (含 Zeocin 100 μg/mL), 30 ° 培养 2 ~ 4 d。取平板上生长的抗性菌落 (编号) 先接种 MM 平板, 再接种 MD 平板, 置 30 ° 培养 2 ~ 3 d, 通过观察生长速度鉴定其表型。用蜗牛酶及酚/氯仿等提取酵母转化菌 DNA 为模板, 用原引物扩增 SARS-CoV M 基因, 条件同前。

1.9 初步诱导表达

挑取 8 个表型为 Mut⁺ 的转化菌用 BMGY 振荡培养至对数生长期 (OD₆₀₀ 为 2 ~ 6), 离心收集的酵母细胞用 BMMY 重悬, 使其最终 OD₆₀₀ 约为 1.0, 置 30 ° 振荡培养 96 h, 每 24 h 加入终浓度为 1% 的甲醇, 并间隔 12 h 取样 0.5 mL, 分离上清进行 SDS-PAGE 电泳 (5% 浓缩胶, 8% 分离胶), 考马斯亮蓝染色观察蛋白质带, 确定表达蛋白质分子量, 并用蛋白薄层扫描测定其表达的含量。

1.10 免疫印迹

将 SDS-PAGE 凝胶转印 NC 膜, 封闭洗涤后加入 SARS 病人恢复期血清, 孵育洗涤后按常规方法加入山羊抗人酶标二抗与底物进行显色反应。

2 结果

2.1 RT-PCR

在对 SARS-CoV 组织培养上清提取的 RNA 进行 RT-PCR 后, 电泳结果显示, 可扩增出与预期大小完全一致的约 679 bp 的条带 (包括内切酶位点长度)。

2.2 克隆与鉴定

将所扩增的特异大小的 DNA 片段克隆到 pPICZ B 载体。并对获得的克隆进行 *KpnI*/*XbaI* 双酶切初步鉴定和 PCR 鉴定, 鉴定结果如图 1。

2.3 序列分析和同源性比较

鉴定后的阳性克隆进行序列分析。结果发现, 阳性克隆质粒中 M 基因测序结果与 GeneBank 中的 GZ60, SZ1, SZ3 中相应序列完全相同, 与 GZ50, HKU-36871, GZ43, SZ16, SZ13, AS, HSR1, Sin2 774, GD01, Sin2 500, Sin2 677, Sin2 679, Sin2 748, ZMY1, CUHK-W1, ZJ01, BJ04, BJ03, BJ02, TOR2,

TW1, BJ01, PUMC03, PUMC02, PUMC01, CUHK-Su10 等株 SARS-CoV 的相应序列各有一个核苷酸的差异。

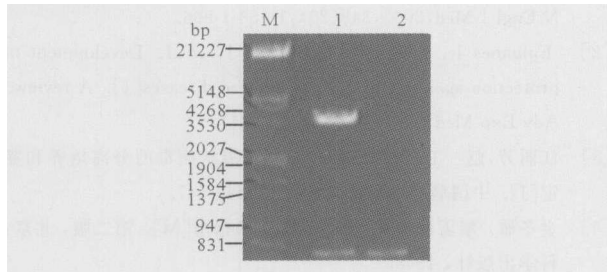


图1 阳性克隆的鉴定

Fig. 1 Detecting of recombinant clone

M, DNA Markers; 1, The digesting of *KpnI/XbaI*; 2, Amplifying M gene by PCR from recombinant clone.

2.4 电转化菌鉴定

转化后 Zeocin 筛选获得十多个单菌落,用 MM/MD 平板生长试验鉴定其表型,得到在 MM/MD 正常生长的 Mut⁺ 菌(快速生长型)。以提取的酵母转化菌的 DNA 为模板,用原引物进行 PCR 扩增,可得到 679bp 的片段,提示 M 基因整合入酵母菌染色体中。

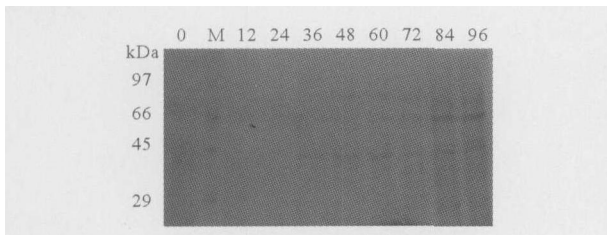


图2 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 The result of SDS-PAGE

M, Protein Marker; 0/12/24~96, The hours of inducing by methanol

2.5 初步表达

Mut⁺ 表型菌用 1% 甲醇诱导表达,取上清 SDS-PAGE 电泳与染色可见一相对分子量为 65kD 和 42kD 的蛋白质条带,如图 2。蛋白薄层扫描测定其表达量占总蛋白质含量分别为 25.97% 和 11.29%。

2.6 表达产物鉴定:

免疫印迹结果显示(如图 3), 65kDa 和 42kDa

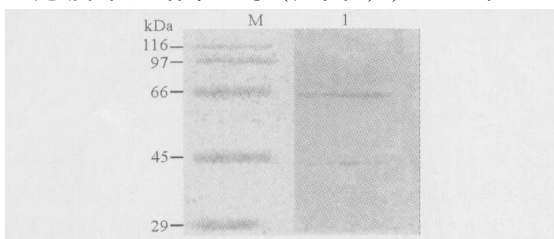


图3 免疫印迹结果

Fig. 3 The result of western blotting

M, Protein Marker; 1, Protein M of SARS-CoV.

的蛋白质均可与 SARS 病人恢复期血清特异结合,表明这些蛋白质均是酵母菌分泌表达的 SARS-CoV M 蛋白质。

3 讨论

SARS-CoV 是一种有包膜的正链 RNA 病毒,它复杂的基因组结构含有多个独立基因,合成一系列病毒结构和非结构蛋白分子。其中,病毒包膜含两到三种跨膜糖(M)蛋白,作为连接核衣壳和病毒包膜的桥梁。抗 M 蛋白特异性单抗能在补体存在下中和病毒的感染性^[5]。人们对冠状病毒科其它病毒如禽传染支气管炎病毒(Avian infections bronchitis virus, IBV)、鼠肝炎病毒(Murine hepatitis virus, MHV)和牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCV)等的研究表明 M 蛋白对于冠状病毒在感染细胞中装配、出芽释放和包膜形成等方面起重要作用。它主要决定病毒体形成,可选择性地结合刺突蛋白(S 蛋白)进行病毒装配,还可与核蛋白(N 蛋白)结合,可能也与特异性地选择病毒基因组 RNA 进行病毒装配有关。

本实验成功地用巴氏毕赤酵母分泌表达了全长 SARS-CoV M 蛋白。巴氏毕赤酵母是近来兴起的外源蛋白的高效表达系统,它具有目前已知最强的启动子-AOX 启动子;可进行高密度培养,利于工业化生产;产物既可胞内表达又可分泌表达,我们实验选择的是分泌表达载体,特别易于纯化;产物表达量高,杂蛋白少,特别是在发酵罐中大量培养时,每升产量最高可达十几克;整合表达,菌株遗传稳定;且产物糖基化位点为 Asn-X-Ser/Thr,与哺乳细胞相同,适合医用。实验中在葡萄糖或甘油为碳源的培养基(BMGY)上生长时,巴氏毕赤酵母表达宿主菌中 AOX1(醇氧化酶)基因表达受到抑制,而在以甲醇为唯一碳源(BMMY)时,PAOX1 启动子被强烈诱导,使外源蛋白大量表达。实验中由于转化菌的表型(Mut)对外源蛋白质的表达量与高峰时间起决定作用,因此需进行转化菌的表型鉴定。但在实验中我们发现由于 M 基因较小(小于 1 Kb),电转化获得的抗 Zeocin 转化子不是很多,我们用 MM/MD 生长试验观察各菌落,根据其生长速度区分 Mut⁺(快速生长型)与 Mut^s(缓慢生长型),并选择 Mut⁺ 酵母菌在含甲醇的培养基中进行诱导表达。本实验中筛选出的 Mut⁺(快速生长型)重组酵母菌,在 1% 甲醇诱导下从第 36h 开始就表达特异蛋白质,在第 84h 达到高水平的表达;96h 维持在高水平。实验过程中在约 65kDa 和 42kDa 处均有蛋白表达,且

65kDa 处蛋白明显多于 42kDa 处,但均能与 SARS 病人恢复期血清特异结合,我们推测 65kDa 可能为 M 蛋白二聚体,且糖基化等修饰少于单体 42kDa 的 M 蛋白。巴氏毕赤酵母表达出全长 SARS-CoV M 蛋白,为进一步的研究 SARS-CoV M 蛋白的结构与功能奠定了基础。

另外,本研究扩增的 M 基因片段序列测定结果表明,与 26 株从不同地区分离的已知 SARS-CoV 高度同源,证实所扩增的片段确实为 SARS-CoV 所特有。另一方面,也说明所扩增部分的序列保守性较高,适于用作 SARS-CoV M 蛋白的结构与功能等分析。

参考文献

- [1] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20):1953-1966.
- [2] Enjuanes L, Smerdou C, Castilla J, *et al.* Development of protection against coronavirus induced diseases[J]. A review. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 380:197-211.
- [3] 江丽芳,赵卫,晏辉钧,等. SARS 冠状病毒的分离培养和鉴定[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(6):544-547.
- [4] 金冬雁,黎孟枫,等. 分子克隆实验指南[M]. 第二版,北京:科学出版社,1998.
- [5] 董德妍,汪晓华,王纓,等. SARS:非典型肺炎相关病毒[J]. *生命的化学*, 2003, 23(3):165-166.