

SARS 冠状病毒 M 蛋白的原核表达及其 DNA 疫苗构建*

李建娜¹, 向开军², 周 荣¹, 丁勇强², 白培胜², 张裕平², 朱 冰¹, 曾其毅^{1**}

(1, 广州市儿童医院/广州市儿科研究所, 广东广州 510120 ;2, 广州华银基因科技有限公司, 广东广州 510150)

Expression of SARS Coronavirus Membrane Protein and its DNA Vaccine Construction *

LI Jian-na¹, XIANG Kai-jun², ZHOU Rong¹, DING Yong-qiang², BAI Pei-sheng²,
ZHANG Yu-ping², ZHU Bing¹, ZENG Qi-yi^{1**}

(1, Central lab of Guangzhou Children's Hospital/ Guangzhou Pediatric Institute, Guangzhou 510120, China; 2, Guangzhou Huayin Gene CO. Ltd., Guangzhou 510150, China)

Abstract: To study the immunological speciality of M protein of SARS-CoV and analyze the feasibility and necessity of M protein as the component of the SARS vaccine. M protein of SARS-CoV was expressed in *E. coli* by pET-15b and pET-22b and purified by affinity resin as antigen. M gene was cloned into the eukaryotic secretory expression plasmid pSecTagB and named recombinant plasmid pSecM as DNA vaccine which will be used to immunize BALB/c mice to obtain the antiserum of M protein. The immune effect of the M-DNA vaccine was studied by the ELISA technique established with purified M protein. Both of the recombinant M proteins can be expressed in soluble form. When compared with the SARS-CoV ELISA kit produced by Huada Co. Ltd, the prokaryotic recombinant M proteins could react specifically with the sera from immunized M-DNA mice and SARS correct diagnosis patients. The recombinant M protein could be used as an antigen to detect SARS, and the SARS-CoV M gene vaccine could induce specifically antibody. M protein could be considered as SARS-CoV vaccine, especially as the vaccine component, which redounds to the development of a potential DNA vaccine.

Key words: Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV); Membrane protein; DNA vaccine

摘要:为探讨 SARS-CoV 的 M 蛋白的免疫学特性以及 M 蛋白作为 SARS-CoV 病毒疫苗组分的可行性和必要性。分别用 pET-15b 和 pET-22b 在大肠杆菌中表达 SARS-CoV 的 M 蛋白,亲和层析纯化后作为抗原应用。同时,将 M 蛋白的编码基因克隆进分泌型真核表达载体 pSecTagB 中得到重组质粒 pSecM 作为 DNA 疫苗,免疫 BALB/c 小白鼠、制备 SARS-CoV M 蛋白的抗血清。并用纯化后的 M 蛋白建立的 SARS-CoV M 抗体 ELISA 检测技术研究所构建的 M-DNA 疫苗的免疫效果。结果表明:两种重组 M 蛋白在大肠杆菌中均以可溶性形式得到高效表达,经与华大产的用灭活 SARS 全病毒制备的 SARS-CoV 抗体 ELISA 检测试剂盒比较实验,证明该原核表达的重组 M 蛋白能与 SARS 确诊病人血清以及 M-DNA 免疫鼠血清发生特异性抗原抗体反应。这两种重组 M 蛋白有可能作为抗原组分用于临床 SARS-CoV 检测中;所构建的 SARS-CoV 的 M 基因核酸疫苗能在小鼠体内产生特异性抗体,提示 M 蛋白在 SARS-CoV 疫苗尤其是组分疫苗的研制中应加以考虑,为 DNA 疫苗的开发提供了依据。

关键词: SARS 冠状病毒; M 蛋白; DNA 疫苗

中图分类号: R 373 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)02-0113-04

收稿日期:2004-09-03,修回日期:2004-11-12

* 基金项目:广州市科技攻关项目(2003Z1-E011);广州市荔湾区科技攻关项目(20032104056)

作者简介:李建娜,(1979-),女,河北省籍,硕士生,研究方向为应用微生物

** 通讯作者. Corresponding Author. Tel: 020-81886181, E-mail zhou3218@yahoo.com

引发严重急性呼吸道综合症 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 或称传染性非典型性肺炎的病原体是一种新型的 RNA 冠状病毒, 即 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV)^[1-3]。SARS-CoV 中参与病毒组装和细胞侵染过程的物质主要为 4 种结构蛋白 (S、M、N、E), 这些蛋白是决定 SARS-CoV 独特的生物学行为的物质基础^[4]; 其中 M 蛋白基因长度为 663 核苷酸, 编码 221 个氨基酸, 蛋白分子量为 25.1 KD。M 蛋白是负责病毒颗粒组装的主要蛋白之一, 属于 III 型膜蛋白, 它可分为一个大的 C 端内结构域区 (endodomain), 三个跨膜片段和一个短小的 N 端外结构域区 (ectodomain)。病毒外壳组装的驱动力主要来自于 M 蛋白跨膜区的侧向相互作用^[5]。M 蛋白的结构与它的功能相一致, 它横跨包膜, 并且与包膜的形成和膜转运有关, 同时可能参与免疫反应, 这些特性提示 M 蛋白可以作为诊断和疫苗用候选蛋白^[6]。为进一步了解 M 蛋白在病毒免疫学上的作用, 我们用基因工程的方法在大肠杆菌中表达了重组 M 蛋白, 构建了 M 基因的 DNA 疫苗; 并用 ELISA 方法分析了 M 蛋白特异性及其与所构建 DNA 疫苗的免疫学关系, 希望该研究对 SARS 病毒的诊断试剂和 DNA 疫苗的研究和开发能提供有价值的信息。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 TG1 为本实验室保存。原核表达载体 pET-15b、pET-22b 购自 Novagen 公司, 分泌型真核表达载体 pSec TagB 购自 Invitrogen 公司。带有 M 基因的 pMD18-TM 载体质粒, 由本实验室构建, 其原始基因序列来自 GenBank (登录号: A Y351680)。限制性内切酶、Ex Taq 酶、T4 DNA ligase、HRP 标记的羊抗鼠二抗和羊抗人二抗均为 Takara 公司产品; 质粒小量抽提试剂盒, 胶回收试剂盒均购自上海华舜生物技术有限公司; 超纯质粒大量抽提试剂盒购于杭州维特洁生化技术有限公司; 蛋白纯化 Ni²⁺ 亲和胶购自 Amersham Biosciences 公司; 冠状病毒 IgG 抗体检测试剂盒购自北京华大吉比爱生物技术有限公司; 其他普通生化试剂均为分析纯。六周的纯系雌性小鼠 BALB/c 购于广州医学院动物研究室。SARS 确诊病人恢复期血清来自于本院。

1.2 引物

六条引物序列如下:

Pm1 : 5'-CCCCA TAGGCA GACAACGGTACTA

TTACC-3

Pm2 : 5'-CCCGGA TCCTTACTGTACTA GCAAAG
CAATA TT-3

Pm3 : 5'-CCCGGA TCCGGCA GACAACGGTACTA
TTACC-3

Pm4 : 5'-GGGCTCGA GCTGTACTA GCAAAGCA
ATA TT-3

Pm5 : 5'-CGCGGCCCA GCCGGCCGCA GACAACG
GTACTATTACC-3

Pm6 : 5'-CGCGGGCCCTGTACTA GCAAAGCAA
ATT-3

引物为上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3 重组原核表达载体的构建及筛选

1.3.1 表达载体 pM15b 的构建: 以 Pm1 和 Pm2 作引物, 以含 M 基因的 pMD18-TM 质粒为模板通过 PCR 扩增 M 基因, 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物。将得到的片段与载体 pET-15b 分别用 *NdeI*/*Bam*HI 双酶切, 电泳回收后将载体和片段连接, 即得到的重组表达质粒 pM15b^[7], 相应的重组蛋白简称 M15b。将 pM15b 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)、提取质粒、通过质粒酶切电泳图谱筛选阳性克隆。

1.3.2 表达载体 pM22b 的构建: 以 Pm3 和 Pm4 作引物、含 M 基因的 pMD18-TM 质粒为模板扩增 M 基因, 电泳回收 PCR 产物, 将得到的片段和载体 pET-22b 分别用 *Bam*HI/*Xho*I 双酶切, 电泳回收后将载体和 M 基因连接, 即得到重组质粒 pM22b, 其相应的重组蛋白简称 M22b。将 pM22b 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)、提取质粒、再用双酶切, 以筛选阳性克隆。

1.4 重组 M 蛋白 (M15b 和 M22b) 的原核表达

挑取阳性克隆的单菌落接种于 LB 液体培养基中 (含 Amp 100mg/mL) 培养至 OD₆₀₀ 0.6 时加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L 诱导表达, 37 °C, 200r/min 摇床培养 3h 后离心收获菌体^[8]。然后进行 12% SDS-PAGE 电泳、分析结果。

分别接种阳性重组菌至 3ml LB 试管中过夜, 次日以 1/50 体积接种于 100ml LB 培养基中 37 °C, 200r/min 培养 3h 中大量表达, 离心, 弃上清收获菌体, 加入 20mL PBS (pH 7.2~7.4) 溶解后, 超声波破碎细胞, 将破碎后的菌液以 10 000r/min 离心, 收集上清和沉淀分别作 SDS-PAGE 电泳、分析结果。

1.5 重组蛋白纯化

Ni 离子亲和纯化柱采用 Amersham Biosciences 公司产品, 操作步骤参照产品说明手册。将纯化的蛋白过柱纯化以后作 SDS-PAGE 电泳验证其

纯度。

1.6 DNA 疫苗的构建

以 Pm5 和 Pm6 作引物,以含 M 基因的 pMD 18-TM 质粒为模板扩增 M 基因,琼脂糖凝胶电泳回收,分别用 *SfiI/ApaI* 双酶切片段和载体 pSec TagB,经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收后将载体和片段连接,将连接产物转化入 TG-1 感受态细胞,挑取几个单菌落培养,抽提重组质粒,进行双酶切和 PCR 鉴定,即得到正确的重组质粒 pSecM。

1.7 DNA 疫苗的免疫

pSecM 质粒转化大肠杆菌 TG-1,接种转化子于 200mL LB 也替培养基 37 培养过夜,收集菌体,然后用超纯质粒大量抽提试剂盒抽提,将质粒溶解于 PBS 中使其终浓度约 1mg/mL。雌性 BALB/c 小鼠分为两组(每组 4 只)。在免疫小鼠前 3d 给小鼠大腿肌肉注射盐酸普鲁卡因(100μL/只)^[9]。3d 后在相同位置肌肉注射重组质粒 pSecM(100μL/只),每隔两周注射一次,共免疫 3 次。另外一组 4 只小鼠以同样的方法注射 pSec TagB,作为空白对照组^[10]。

1.8 酶联免疫 ELISA 检测

分别用纯化的 M15b 和 M22b 以 1μg/孔铺板,4 过夜,1% 的 BSA 封闭 2h;每种重组蛋白分为两部分,一部分加入鼠血清,一部分加入 SARS 病人恢复期血清(1:100,用 1%BSA 稀释)作为第一抗体(37 孵育 1h);然后,分别加入 1:1000 稀释的羊抗鼠二抗和羊抗人二抗(37 孵育 1h),每步均用 PBST(PBS + Tween 20)洗板;最后加入含底物 TMD 的缓冲液,暗处作用 5min 后,加入 50 μL 浓度为 2 mol/L 的硫酸终止反应;在 450 nm 下测定光吸收值。阴性抗原对照孔为 1% 的 BSA,阴性血清对照孔分别加入免疫 pSec TagB 的鼠血清和正常人血清,阳性血清对照孔加入已确诊为 SARS 病人的恢复期血清。样本光吸收值大于或等于阴性数值的 2.1 倍,即可判定为阳性。并用北京华大吉比爱生物技术有限公司的冠状病毒 IgG 抗体检测试剂盒(灭活全病毒包被板)作平行实验进行比较,基本操作参照试剂盒说明书。

2 结果

2.1 重组表达质粒和核酸疫苗 pSecM 的构建

原核表达载体 pET-15b 和 pET-22b 以及真核分泌型表达载体 pSec TagB 的大小分别约为 5.7kb、5.5kb 和 5.2kb,重组质粒 pM15b、pM22b 和 pSecM 分别经双酶切和 PCR 验证,证明 M 基因片

段已经正确克隆在表达载体中(图 1)。

2.2 重组 M 蛋白的表达和纯化

含重组质粒 pM15b 和 pM22b 的大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示在约 27kDa 处有较强的表达蛋白带。经扫描分析目的蛋白 M15b 和 M22b 分别约占菌体总蛋白量的 25% 左右,这说明目的蛋白在两个不同的表达载体中均得到高效表达。用超声波破碎表达的菌体,高速离心后取上清和沉淀经 12% 的 SDS-PAGE 电泳,发现重组蛋白 M15b 和 M22b 主要在上清中出现,故融合蛋白为可溶性表达(图 2)。由于重组蛋白 M15b 和 M22b 分别在 N 端和 C 端融合了 6 个组氨酸残基,所以二者均可经 N^{i2+} 亲和胶柱纯化,纯化后的蛋白去除了绝大部分菌体杂蛋白,纯度可以达到 90%(图 2)。

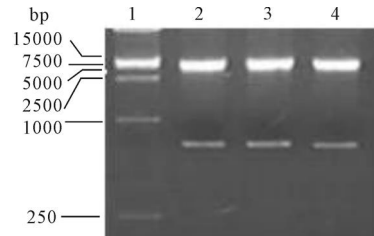


图 1 重组质粒的酶切验证

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid 1, DNA / *EcoR I* + *HindIII*; 2, pM15b digested by *NdeI* and *BamHI*; 3, pM22b digested by *BamHI* and *XhoI*; 4, pSecM digested by *SfiI* and *ApaI*

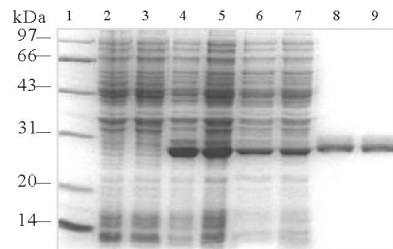


图 2 SARS-CoV M 重组蛋白的表达及纯化 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of SARS-CoV M recombinant proteins

1, Protein marker; 2, pET-15b; 3, pET-22b; 4, Induced M15b; 5, Induced M22b; 6, Supernatant fluid of M15b protein; 7, Supernatant fluid of M22b protein; 8, Purified M15b; 9, Purified M22b.

2.3 重组蛋白 M15b 和 M22b 的酶联免疫检测

以纯化的 M15b 和 M22b 蛋白作为抗原,采用 SARS 病人恢复期血清为抗体进行 ELISA 检测,并与华大灭活全病毒抗体检测试剂盒(下表中 SARS-CoV)平行试验比较,结果表明重组蛋白 M15b 和 M22b 均能与 SARS 病人血清发生特异性的抗原抗体反应,而与正常人血清为阴性反应。同时,检测免

疫 pSecM 后的鼠血清中是否存在抗 SARS-CoV M 蛋白的抗体,接种空质粒 pSec TagB 的鼠血清作为鼠阴性血清对照,牛血清白蛋白(1%BSA)作为抗原阴性对照。ELISA 结果见下表,以下每个数值均为 4 次重复试验的平均值。

表 1 不同抗原检测 SARS 病人血清和鼠血清中抗 SARS-CoV IgG
Table 1 Detection of anti-SARS-CoV IgG in sera of SARS patients and mice using different antigens

Antigens	SARS patients	normal persons	pSecM (mice)	pSec TagB. (mice)
M15b	1.860 ±0.15	0.149 ±0.14	1.062 ±0.09	0.404 ±0.05
M22b	1.793 ±0.16	0.129 ±0.17	1.117 ±0.10	0.429 ±0.07
SARS-CoV *	2.470 ±0.18	0.454 ±0.14	1.856 ±0.17	0.275 ±0.07
1%BSA	0.116 ±0.03	0.073 ±0.05	0.140 ±0.03	0.068 ±0.04

* Huadainactive SARS-Cov kit antigen detection

3 讨论

用本研究中大肠杆菌表达的重组蛋白 M15b、M22b 和华大灭活全病毒抗体检测试剂盒实验结果表明对于 SARS 病人血清和免疫了 M-DNA 疫苗的鼠血清,都可以产生特异性抗原抗体反应,这说明 SARS-CoV M 蛋白具有完整的免疫原性、特异性反应原性,提示其具有可能作为检测 SARS 的抗原组分和疫苗组分的潜质性。

为了解在大肠杆菌中表达的重组蛋白与天然状态下病毒颗粒的 M 蛋白在检测上是否有明显的差异,我们用原核表达的 M 蛋白和全病毒包被的病毒蛋白分别作抗原铺板,ELISA 检测结果相近,这说明我们采用原核表达系统表达的蛋白保留了类似天然病毒 M 蛋白的抗原表位。

本研究中,我们使用了一种新的分泌型真核表达载体 pSec TagB 来构建 M 基因的 DNA 疫苗,结果表明,注射了 DNA 疫苗 pSecM 的小鼠,其血清以 1:100 稀释后仍能与原核表达的重组 M 蛋白和灭活的天然全病毒发生特异性反应,提示所构建的重组子具有 SARS CoV M 基因 DNA 疫苗的特性,表

明分泌型真核表达载体 pSec TagB 是一个较好的 DNA 疫苗载体系统的选择。

重组 SARS-CoV M 蛋白能与 SARS 确诊病人恢复期血清发生特异性反应表明,SARS-CoV M 基因具有独立的抗原表位和免疫学特性,提示 M 抗原或其 DNA 疫苗具有作为 SARS-CoV 蛋白组分疫苗或 DNA 组分疫苗的组成成分之一,有关可行性值得进一步的研究,以为 SARS-CoV 的防控服务。

致谢:感谢盛慧英提供部分实验帮助。

参考文献

- [1] Drosten C, Gunther S, Preiser, *et al.* Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1967-1976
- [2] Marra M A, Jones S J, Astell C R, *et al.* The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1394 ~ 1399.
- [3] 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(20): 1953-1966
- [4] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1394-1399.
- [5] Wang C Z, Qi Z H. The Biological Characteristics of SARS Virus and Its Related Coronavirus[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(6): 495-502.
- [6] Qin E D, Zhu Q Y, Yu M, *et al.* A complete sequence and comparative analysis of strain (BJ01) of the SARS-associated Virus[J]. *Chinese Sci Bull*, 2003, 48(10): 941-948.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 等. 分子克隆克隆试验指南[M]. 第三版, 北京: 科学技术出版社, 2003.
- [8] Yu H, Yang Y, Zhang W, *et al.* Expression and Purification SARS Coronavirus Spike protein[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(8): 774-778.
- [9] Whitton J L, Rodriguez F, Zhang J, *et al.* DNA immunization: Mechanistic studies[J]. *Vaccine*, 1999, 17(13-14): 1612-1619.
- [10] Zhao P, Ke J S, Qin Z L, *et al.* DNA Vaccine of SARS-CoV S Gene Induces Antibody Response in Mice[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(1): 37-41.