

SARS 冠状病毒 S 蛋白片段 2 的表达纯化与多克隆抗体的制备 *

秦 莉¹, 吴少庭^{2**}, 王西明¹, 袁仕善², 黄达娜², 雷民军¹, 潘晖榕¹,
高世同², 张仁利², 屈 伸¹

(1. 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 湖北武汉, 430030; 2. 深圳市疾病预防控制中心分子生物室, 广东深圳, 518020)

Purification of Glutathione S-transferase Fusion Proteins of SARS Coronavirus

Spike Protein Fragment 2 and Preparation of Anti-GST-S2 Polyclonal Antibody

QIN Li¹, WU Shao-ting^{2**}, WANG Xi-ming¹, YUAN Shi-shan², LEI Ming-jun¹, PAN Hui-rong¹,
HUANG Da-na², GAO Shi-tong², ZHANG Ren-li², QU Shen¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, 430030, China. 2. Shenzhen Center of Disease Control and Prevention, Shenzhen, 518020, China)

Abstract: To study the immunogenicity of spike protein of SARS coronavirus, an expressional plasmid was constructed encoding partial sequence of SARS Coronavirus spike protein from 2170 bp to 2814bp, named fragment-2 (S2). The gene sequence encoding S2 was amplified by RT-PCR from SARS Coronavirus genome RNA, cloned to pMD18-T vector and subcloned to pGEX-4T-2. *E. coli* JM109 that contained recombinant expression vector pGEX-S2 was amplified and fusion protein expression was induced by 1mmol/L IPTG at 37 °C. Protein was extracted and purified by GSTH-Sepharose affinity chromatography. After identified by the serum of SARS patient by Western-blot, the purified protein GST-S2 was used to immunize NIH mice three times at two weeks interval, the immunized mice produced high titer anti-GST-S2 polyclonal antibody. It lies a basis for the future study of subunit vaccine of SARS coronavirus.

Key words: Severe acute respiratory syndrome (SARS); Coronavirus; Spike protein; Affinity chromatography; Polyclonal antibody

摘要:采用 RT-PCR 技术从 SARS 冠状病毒基因组扩增编码 S 蛋白的 s2 基因片段(第 2170 到 2814 位碱基),克隆到 pMD18-T 载体并测序。用限制性内切酶消化后, S2 基因亚克隆至表达载体 pGEX-4T-2, 转化大肠杆菌 JM109, 筛选鉴定阳性菌落。扩增培养含 pGEX-S2 质粒的 JM109 大肠杆菌, 经 IPTG 诱导, 超声破菌, GSTH-Sepharose 亲和层析纯化目的蛋白, Western-blot 检测 SARS 患者血清可以识别纯化的蛋白。用此蛋白免疫 NIH 小鼠, 获得了高滴度抗 GST-S2 抗体的血清, 为进一步研究 SARS 冠状病毒的亚单位疫苗奠定基础。

关键词: SARS; 冠状病毒; S 蛋白; 亲和层析; 多克隆抗体

中图分类号: R 511 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0217-04

SARS 冠状病毒 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 是导致严重急性呼吸综合征 (SARS) 的病原, 其基因组编码复制酶多聚蛋白, 棘突蛋白 (S), 包膜蛋白 (E), 基质膜蛋白 (M), 核衣壳蛋白 (N) 几种主要蛋白^[1,2]。其中棘突

蛋白 (S 蛋白) 是 SARS-CoV 入侵宿主细胞, 引起免疫反应及中和抗体产生有关的主要蛋白^[3]。因此在 SARS-CoV 疫苗的研究中, S 蛋白成为一个最重要的靶蛋白。但 s 基因全长 3 768 bp, 编码 1 255 个氨基酸, 结构上分为 N 端的球状结构域 S1 和 C

收稿日期: 2004-10-21, 修回日期: 2005-03-01

* 基金项目: 深圳市科委资助项目 (J2003J74)

作者简介: 秦莉, 女, 湖北十堰籍, 博士研究生, 研究方向为基因工程重组疫苗。

** 通讯作者: 吴少庭, 男, 湖北省籍, 主任医师, 教授, 研究方向为感染性疾病的重组疫苗。

Corresponding author, Tel: 0755-25505595, E-mail: wshaoting@263.net

端的棒状结构域 S2, S1 识别结合宿主细胞膜上的受体, S2 与病毒外壳膜与宿主细胞膜的融合有关^[4,5]。本实验室根据 S 蛋白的抗原表位分析结果, 选择抗原表位相对集中的两段序列 S1 (S 蛋白的第 108 到 488 位氨基酸序列) 和 S2 (S 蛋白的第 724 到 938 位氨基酸)^[6] 进行了克隆。本研究中我们在大肠杆菌中表达 GST-S2 融合蛋白, 并通过亲和层析纯化 GST-S2 融合蛋白, 用它免疫 NIH 纯系小鼠, 获得抗 S2 的多克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 试剂和实验动物

SARS 冠状病毒培养上清由广东省深圳市疾病预防控制中心微生物检验科何雅青副主任技师提供; SARS 患者急性期血清由广东省深圳市疾病预防控制中心微生物检验科刘建军医生提供。12 周大 NIH 雄性小鼠由本中心动物房提供。E coli JM 109、表达载体 pGEX-4T-2, Glutathione SepharoseTM4B 购自 Amersham Biosciences 公司。病毒 RNA 纯化试剂盒是德国 QIAGEN 公司产品。pMD18-T 载体, RT-PCR 反应试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA 的胶回收试剂盒、限制性核酸内切酶和连接酶为大连宝生物工程公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自美国 Pierce 公司。化学试剂购自上海生工生物工程公司。

1.2 pGEX-S2 表达质粒的构建

参照试剂盒说明提取 SARS-CoV 基因组 RNA, 根据 GenBank 中登录的 S 蛋白的基因序列 (gi34482146) 合成引物: 正向引物 5'-AGGATCC ATCTGCGGA GATTCTACTGA-3', 反向引物 5'-AGTCGACA GCA TTCTGGTAAACAACGT-3', 按照 RT-PCR 试剂盒说明设置条件如下: 50 30min; 94 2min 后, 94 30sec、55 30sec、72 2min, 30 个循环。回收产物, 克隆至 pMD18-T 载体, 筛选阳性克隆送测序。提取 pMD18-S2 和 pGEX-4T-2 质粒分别用 BamH 和 Sal 双酶切, 将目的基因和载体连接, 构建 pGEX-S2 质粒, 转化大肠杆菌 JM109, PCR 筛选阳性克隆。

1.3 GST-S2 融合蛋白的诱导表达

pGEX-S2 JM109 菌液加入 IPTG 诱导 6h, 收集细菌重悬于细菌裂解液中 (0.1mol/L PBS, pH 7.3, 10mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 1% TritonX-100), 反复冻融并超声裂菌。4 20 000g 离心 10min, 分离上清, 沉淀用 6mol/L 尿素 4 溶解过夜。取全菌, 上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳拍

照, Grab-IT 软件分析目的蛋白的表达量。

1.4 GST-S2 融合蛋白的纯化

接种阳性重组菌到 LB 培养基 (含氨苄青霉素 100μg/mL) 中, 37 培养至 A₆₀₀ 约为 0.9 时, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37 诱导 6h。离心收集细菌, 重悬于 PBS 中, 破菌后收集上清用 Glutathione SepharoseTM4B 亲和层析纯化。沉淀用 2% 脱氧胆酸钠 (DOC) 的缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl, 0.5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 5% 甘油, 0.3mmol/L DTT) 充分重悬并放置 20min, 离心收集沉淀, 重复一次。再加入含 0.3% 十二烷基肌氨酸钠 (SKL) 的缓冲液 A, 剧烈搅拌重悬沉淀, 放置至少 0.5h。4 20 000g 离心 10min, 收集上清, 用缓冲液 A 稀释 10 倍后, 4 对缓冲液 A 透析去除 SKL, 再对 PBS 进行透析后用 Glutathione SepharoseTM4B 亲和层析纯化。纯化样品进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 纯化蛋白的 Western-blot 鉴定

纯化后的 GST-S2 融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 夹心法电转移到硝酸纤维素薄膜 (NC 膜) 上, NC 膜置于 0.5g/L 脱脂奶粉溶液中, 37 放置 2h, 洗涤后依次加入 SARS 病人康复期血清 (1:50 稀释), 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG, 各在 37 放置 2h。洗涤后 DAB 显色。

1.6 抗 GST-S2 融合蛋白多克隆抗体的制备和鉴定

纯化得到的 GST-S2 融合蛋白真空冻干, 经紫外分光光度计定量后, 与 CFA 以 1:1 的比例 (W/W) 超声乳化混匀, 接种 NIH 雄性小鼠背部皮下。每只小鼠于 0、2、6 周接种 50μg 抗原, 以 CFA 做对照。并于 0、2、6、7 周采尾静脉血, 第 10 周摘眼球取血, 分离血清 -20 保存。将制备的 GST-S2 融合蛋白包被聚苯乙烯反应板, 间接 ELISA 法测定血清滴度。并把纯化的 GST-S2 经 SDS-PAGE 后进行 Western-blot 检测抗体的特异性, 一抗用 1:3 000 稀释的免疫小鼠血清, 二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG。

2 结果

2.1 pGEX-S2 表达质粒的构建

从 SARS-CoV 基因组 RNA 中扩增至 645bp 的 S2 片段, 通过测序与 GenBank 登陆的序列有 99% 的同源性, 亚克隆到 pGEX-4T-2 表达质粒后, 筛选阳性菌, 经 PCR 和双酶切鉴定, 成功构建了 pGEX-S2 的表达质粒。结果见图 1。

2.2 GST-S2 融合蛋白的诱导表达

pGEX-S2 JM109 用不同温度和 IPTG 浓度诱

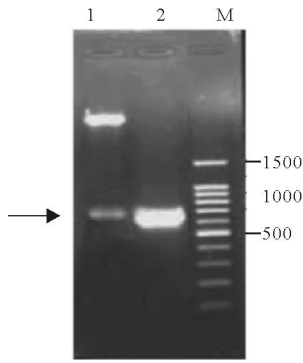


图1 pGEX-S2的PCR和酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pGEX-S2

1, pGEX-S2 digested with *Bam*H and *Sal*I; 2, Clony PCR product of pGEX-S2; M, DNA Marker.

导后,获取全菌、上清和沉淀,经 SDS-PA GE 电泳后分析目的蛋白的表达效率,结果见图 2。用 1mmol/L IPTG 在 37 和 23 诱导目的蛋白表达量均占菌体总蛋白的 13%,而且 37 (7%) 诱导时细菌裂解上清中的目的蛋白含量高于 23 (4.4%) 诱导。降低 IPTG 的浓度,目的蛋白表达量也降低,但在 23 时 0.1mmol/L IPTG(5.8%) 诱导时上清中的目的蛋白含量比 1mmol/L IPTG 诱导时多。

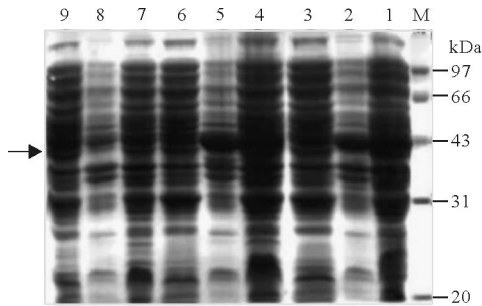


图2 pGEX-S2 JM109 不同温度和 IPTG 浓度诱导

Fig. 2 GST-S2 induced with different temperatures and IPTG concentrations

M, protein marker; 1/2/3, Lysate, precipitation and supernatant induced by 1mmol/IPTG, 37, respectively; 4/5/6, Lysate, precipitation and supernatant induced by 1mmol/IPTG, 23, respectively; 7/8/9, Lysate, precipitation and supernatant induced by 0.1 mmol/IPTG, 23, respectively.

2.3 GST-S2 融合蛋白的纯化

经 Glutathione Sepharose™ 4B 亲和层析纯化的 GST-S2 融合蛋白经 SDS-PA GE 电泳染色后结果见图 3,可见到纯化得到了约为 45kDa 左右的蛋白。

2.4 纯化的 GST-S2 融合蛋白的鉴定

Western-blot 检测显示纯化的 GST-S2 融合蛋白可以被康复期 SARS 病人的血清识别,结果见图 4。

2.5 抗体 ELISA 效价的测定和抗体的特异性检测

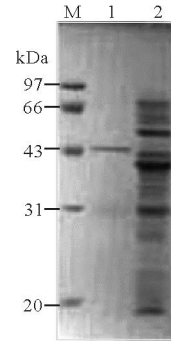


图3 纯化 S2 蛋白的电泳图谱

Fig. 3 SDS-PA GE of purified S2 protein

M, Protein marker; 1, Purified S2 protein; 2, Supernatant of engineering JM109 lysate.

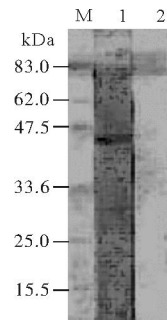


图4 SARS 病人血清识别 GST-S2

Fig. 4 Immunoblot of purified S2 protein

M, Pres tained protein marker; 1, Serum of SARS patients; 2, Normal human sera.

纯化的 GST-S2 与 CFA 混和后共免疫小鼠三次,以 50μg/mL 的纯化抗原包被进行 ELISA 测定,以 P/N 大于 2 为阳性,结果第一,二,三次免疫后抗体效价分别达到了 1 400,1 12 800,1 12 800,表明该抗原能诱导小鼠产生较强的免疫应答。为了进一步检测制备的多克隆抗体的特异性,我们把纯化的 GST-S2 进行 SDS-PA GE,Western-blot 检测显示制备的小鼠血清可以有效识别纯化抗原,结果见图 5。

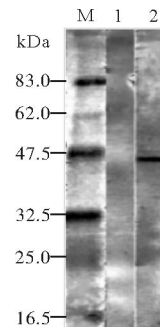


图5 免疫小鼠血清识别 GST-S2 蛋白

Fig. 5 Immunoblot of GST-S2 by mice serum

M, Prestained protein marker; 1, Serum of mice injected complete Freund's adjuvant; 2, Serum of mice injected GST-S2.

3 讨论

pGEX 表达载体是谷胱甘肽转移酶(GST)表达载体系列,该表达载体是专为外源多肽能在大肠杆菌中表达,并可在非变性的条件下快速纯化而设计的,其表达的外源多肽与大约 26kDa 的 GST 的 C 末端融合而形成融合蛋白。本研究选用质粒 pGEX-4T-2 作为 SARS-CoV 的 S 蛋白的表达载体,利用基因重组技术把 S2 片段的基因装入该载体中,成功构建了 S2 的表达质粒,并通过 IPTG 诱导了它的表达。

具有生物活性重组蛋白的纯化经常为融和蛋白形成包涵体所阻碍。包涵体的主要成份为表达产物,另含有 RNA 聚合酶,外膜蛋白,rRNA,环状和缺口质粒 DNA 及脂质,肽聚糖,脂多糖等^[7]。采用基因工程的手段诱导 S2 融合蛋白的表达时,表达效率达到占菌体总蛋白的 13%,但重组蛋白主要以包涵体的形式存在。为减少包涵体的形成,降低诱导温度和 IPTG 浓度的办法,但效果均不理想。因此把细菌裂解后上清直接纯化,沉淀用 DOC 反复洗涤以得到纯的包涵体,采用 0.3%SKL 溶解包涵体,然后通过透析去除 SKL 使靶蛋白复性,再通过 Glutathione Sepharose™ 4B 亲和层析得到纯化的 GST-S2 融合蛋白。一般采用高浓度的尿素或盐酸胍溶解包涵体,本实验参照文献方法采用 SKL 这种温和的去污剂溶解包涵体效果也很好^[8]。在复性的过程中为了防止蛋白质形成沉淀,把变性产物稀释了 10 倍,使复性过程在很低的蛋白质浓度下发生,有效地预防了目的蛋白形成沉淀,但同时也使得目的蛋白受到了极大的稀释,上样体积大大增加。用这种方法纯化的目的蛋白可以被 SARS 病人的血清所识别,用它免疫小鼠,可刺激小鼠产生特异性的

抗体,并且在第二次免疫后抗体滴度就达到了 1 2 800。

在本研究中我们用 Glutathione Sepharose™ 4B 亲和层析的方法纯化得到了 S2 蛋白,不仅可以作为研究 SARS-CoV 分子生物学的重要材料,而且可以作为预防 SARS 的疫苗的重要组成成分。用该蛋白免疫小鼠得到了高滴度的抗体,表明该抗原具有良好的免疫原性,为以后进一步的实验研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 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
- [2] 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
- [3] Marra M A, Jones S J M, Astell C R, *et al.* The genome sequence of the SARS-associated Coronavirus [J]. *Science*, 2003; 300:1399
- [4] Shi L, Zhang Q P, Lu M, *et al.* Preliminarily analyze the structure and function of the putative spike protein of SARS virus. *CMBI*, May 1, 2003 <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/sars/sars-secstructure/spike.htm>.
- [5] 芮伟,张其鹏,石磊,等. SARS 冠状病毒基因组、蛋白质与侵入宿主细胞过程的研究近况[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83:913-921
- [6] 中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心. SARS 病毒的表位分析初步结果. <http://www.biosino.org/feidian/SARS-biaoweifenxi.htm>
- [7] Lin K H, Cheng S Y. An efficient method to purify active eukaryotic proteins from the inclusion bodies in *E. coli*. *Bio Technology* [M], 1991; 11(6):149-153
- [8] 朱厚础. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999.