

# SARS 病毒 S1 基因片段真核表达载体的构建及免疫效果\*

蔡恒玲<sup>1</sup>, 吴移谋<sup>1\*\*</sup>, 万艳平<sup>1</sup>, 肖建华<sup>2</sup>, 杨秋林<sup>2</sup>, 曾桥<sup>2</sup>, 赵飞骏<sup>1</sup>, 唐曼娟<sup>1</sup>

(1. 南华大学病原微生物学教研室, 湖南衡阳, 421001; 2. 南华大学寄生虫教研室, 湖南衡阳, 421001)

## Construction of the Eukariotic Expression Vector for S1 Gene Fragment of SARS-CoV and Study of Its Immunological Effects

CAI Heng-ling<sup>1</sup>, WU Yi-mou<sup>1\*\*</sup>, WAN Yan-ping<sup>1</sup>, XIAO Jian-hua<sup>2</sup>, YANG Qiu-ling<sup>2</sup>, ZENG Qiao<sup>2</sup>, ZHAO Fei-jun<sup>1</sup>, TANG Man-juan<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology, Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Parasitology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**Abstract:** The 801 base pairs of S1 gene fragment were synthesized based on the Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus (SARS-CoV) BJ01 strain registered in GenBank. The synthetical DNA was subcloned into the appropriate site of pcDNA3.1(+), eukariotic expression vector to construct a recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/S1; The recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/S1 was transfected into HeLa cells and the expressed protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting; BALB/c mice were immunized with pcDNA3.1(+)/S1 by i.m. The level of anti-SARS-CoV IgG and IFN- $\gamma$  in BALB/c mice after immunization were detected by ELISA and T cell proliferation activity was tested by MTT. It was found that the recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/S1 could express S1 protein in HeLa cells, T cell proliferative activity, the level of anti-SARS-CoV IgG and IFN- $\gamma$  increased after immunization. It revealed that pcDNA3.1(+)/S1 could induce moderate cellular and humoral immunological reaction in BALB/c mice.

**Key words:** SARS-CoV; S1 gene; Immunological activity; Eukariotic expression

**摘要:**本研究根据 GenBank 登录的 BJ01 株 SARS-CoV 序列合成 801bp S1 基因片段, 该片段被亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+) 得到重组质粒 pcDNA3.1(+)/S1; 转染 HeLa 细胞, SDS-PAGE、Western Blotting 鉴定蛋白表达; 肌注免疫 BALB/c 小鼠, 利用 ELISA 法检测免疫后小鼠的抗 SARS-CoV IgG 及 IFN- $\gamma$  水平, MTT 法检测 T 细胞增殖活性。结果显示, 重组质粒 pcDNA3.1(+)/S1 可在 HeLa 细胞内表达 S1 蛋白, 免疫后小鼠的 T 细胞增殖活性增强, 抗 SARS-CoV IgG 与 IFN- $\gamma$  水平升高。本实验说明 pcDNA3.1(+)/S1 可诱导小鼠产生一定的体液免疫和细胞免疫应答。

**关键词:** SARS 相关冠状病毒; S1 基因; 免疫活性; 真核表达

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)05-0464-04

严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS) 是由 SARS 相关冠状病毒 (Severe acute respiratory syndrome associated coronavirus, SARS-CoV) 引起的急性传染病<sup>[1]</sup>。SARS-CoV 是一种具高度传染性和致病性的新型冠状病毒, 研究开发安全有效的 SARS-CoV 疫苗以控制和消灭 SARS-

CoV 成为目前研究热点。经过对 12 株 SARS 冠状病毒基因序列比较, 发现 S 蛋白的氨基酸突变率仅为 0.23%, 其较高的保守性为疫苗研究奠定了良好的基础, 由此 S 蛋白成为候选疫苗的重要靶位<sup>[2]</sup>。本研究将 SARS-CoV S1 基因片段连至真核表达载体 pcDNA3.1(+), 构建了重组的 pcDNA3.1(+)/S1 真核表

收稿日期: 2005-03-18, 修回日期: 2005-07-16

\* 基金项目: 湖南省教育厅非典攻关课题 (0309)

作者简介: 蔡恒玲 (1976-) 湖南省籍, 助教, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。

\*\* 通讯作者: Corresponding author. Tel: 0734-8281555, E-mail: yimouwu@sina.com

达载体,并初步研究其免疫效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SARS-CoV S1 基因 801bp (22 382bp ~ 23 182bp) 片段由复旦大学遗传工程国家重点实验室参照 GenBank A Y2784884 序列合成,pcDNA3.1(+ ) 真核表达载体为本室保存,琼脂糖回收试剂盒、pUCmr T 载体等购自华美生物公司,IFN- $\gamma$  检测试剂盒购自博士德公司,SARS-CoV IgG 检测试剂盒购自北京华大吉比爱公司。HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗人 IgG 购自北京鼎国公司。

### 1.2 pcDNA3.1(+ )/ S1 载体的构建

根据 GenBank 登录的 BJ01 株 SARS-CoV 核酸序列合成 801bp S1 基因片段,设计特异性引物,在其 5 及 3 端分别加上 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。PCR 扩增目的片段,与 pUCmr T 载体连接后转化 *E. coli* JM109,进行蓝-白斑筛选,用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切及 PCR 鉴定后送奇康公司测序。得目的片段并连入 pcDNA3.1(+ ) 相同位点。筛选出阳性克隆即 pcDNA3.1(+ )/ S1。

### 1.3 SDS-PAGE 与 Western Blotting 鉴定基因疫苗的体外活性

电转染法将 pcDNA3.1(+ )/ S1 转染 HeLa 细胞,培养 48h,收集细胞,裂解后用电转膜法将 SDS-PAGE 上的蛋白转移到 PVDF 膜上,以痊愈 SARS-CoV 病人阳性血清为一抗,HRP-羊抗人 IgG 为二抗,进行免疫杂交。

### 1.4 动物接种

6w 龄正常 BALB/ C 小鼠随机分 3 组,每组 15 只。分别以 pcDNA3.1(+ )、pcDNA3.1(+ )/ S1 及 0.9 % NS 肌注免疫:将制备的 pcDNA3.1(+ )/ S1 垂直注射入股四头肌 (100 $\mu$ g/ 只),并于第 2、4w 各加强免疫一次。

### 1.5 T 淋巴细胞增殖活性测定

免疫完毕后处死小鼠,无菌取脾脏,将脾脏研磨碎,纱网过滤离心,加入 8.3g/ LNH<sub>4</sub>CL,放置 5min 破坏红细胞,800r/ min 离心收集淋巴细胞,含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 悬浮淋巴细胞,调整细胞浓度为 2  $\times 10^6$ / mL,加入 96 孔板,每孔 100 $\mu$ L。分别用 pET-22b/ S1 重组蛋白与 PHA 为刺激物,另外一组用培养液作对照。37  $^{\circ}$ C,5 % CO<sub>2</sub>,48h。MTT 法检测 T 细胞增殖活性:终止培养前 4h 每孔加 MTT20 $\mu$ L,4h,离心,弃上清,每孔加 DMSO150 $\mu$ L,震荡溶解 10min,570nm 波长测定各孔吸光度(A)值,计算各组细胞平

均 A<sub>570</sub> 值。刺激指数:SI = 抗原或 PHA 刺激组平均 A<sub>570</sub> 值/ 对照组 A<sub>570</sub> 值。

### 1.6 细胞因子 IFN- $\gamma$ 检测

免疫完毕后处死小鼠,取脾制备脾淋巴细胞悬液 (方法同前),以 ELISA 法检测 IFN- $\gamma$  (按 IFN- $\gamma$  检测试剂盒操作说明进行)。

### 1.7 SARS-CoV IgG 检测

分别于免疫前、第一次免疫后 1w、2w 及第二次免疫后 2w、第三次免疫后 2w、第三次免疫后 4w 经小鼠眼眶静脉采血,分离血清备用。ELISA 法检测抗 SARS-CoV IgG (按 SARS-CoV IgG 检测试剂盒操作说明进行)。

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1(+ )/ S1 载体的构建

*Bam*H I、*Eco*R I 酶切 pcDNA3.1(+ )/ S1 重组质粒得到大小约为 801bp 的目的片段,PCR 鉴定及测序结果亦显示 S1 基因片段已经定向连至 pcDNA3.1(+ ) (图 1)。

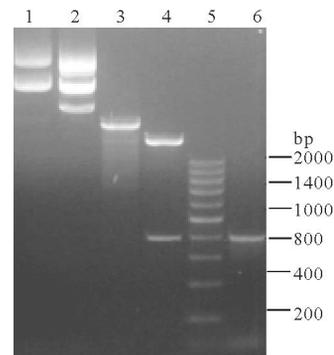


图 1 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切与 PCR 鉴定 pcDNA3.1(+ )/ S1  
Fig. 1 Identification of pcDNA3.1(+ )/ S1 by *Bam*H I and *Eco*R I and PCR

1,pcDNA3.1(+ )/ S1 recombinant plasmid; 2,pcDNA3.1(+ ) plasmid; 3, pcDNA3.1(+ )/ S1 digested by *Bam*H I; 4,pcDNA3.1(+ )/ S1 digested by *Bam*H I, *Eco*R I; 5, 200bp DNA Ladder; 6, PCR products.

### 2.2 转染细胞的检测

pcDNA3.1(+ )/ S1 转染的 HeLa 细胞组在 32 KD 处出现了阳性反应带,而在 pcDNA3.1(+ ) 转染组与 HeLa 细胞对照组相应泳道则没有阳性反应带 (图 2, 3)。

### 2.3 细胞因子 IFN- $\gamma$ 检测

重组质粒免疫组小鼠 IFN- $\gamma$  含量明显上升,为 184.5pg/ mL,而 pcDNA3.1(+ ) 免疫组与 0.9 % NS 免疫组的 IFN- $\gamma$  分别是 20.5pg/ mL 和 8.8pg/ mL, pcDNA3.1(+ )/ S1 免疫小鼠特异性刺激后 IFN- $\gamma$  水平是 pcDNA3.1(+ ) 免疫组的 9 倍,是 0.9 % NS 免疫

组的 21 倍(图 4)。

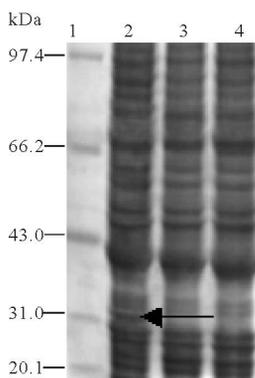


图 2 HeLa 细胞表达 S1 蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of S1 protein from transfected HeLa cells

1, molecular mass markers; 2, HeLa cell transfected with pcDNA3.1(+)/S1; 3, HeLa cell transfected with pcDNA3.1(+); 4, HeLa cell.

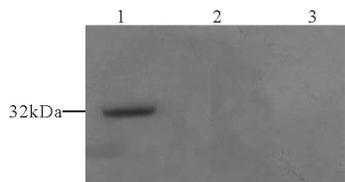


图 3 HeLa 细胞表达 S1 蛋白 Western Blotting 结果

Fig. 3 Western Blotting analysis of S1 protein from transfected HeLa cells

1, HeLa cell transfected with pcDNA3.1(+)/S1; 2, HeLa cell transfected with pcDNA3.1(+); 3, HeLa cell.

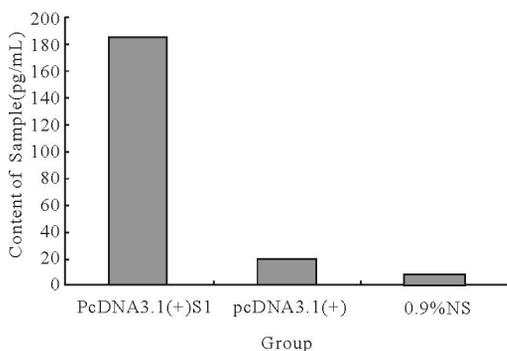


图 4 免疫小鼠 T 淋巴细胞上清中 IFN- $\gamma$  水平

Fig. 4 Detection of IFN- $\gamma$  in supernatant of T lymphocyte from immunized mice

### 2.4 SARS-CoV IgG 检测

随着免疫时间增加,重组质粒免疫组小鼠的抗 SARS-CoV IgG 不断增加,至第 8w 达最高,其他两组 IgG 仅检出低水平抗体,并且这种抗体无时效关系(图 5) ( $F = 39.071, P < 0.01$ )。

### 2.5 T 淋巴细胞增殖活性测定

pcDNA3.1(+)/S1 注射组细胞加入刺激物后,明显增殖, pET-22b/S1 重组蛋白刺激组较 PHA 刺激

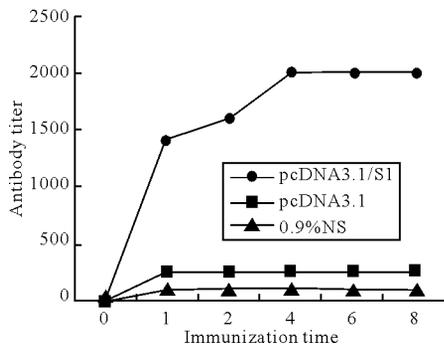


图 5 免疫小鼠血清中抗 SARS-CoV IgG

Fig. 5 Detection of anti-SARS-CoV IgG in sera of immunized mice

组细胞增殖明显活跃,各组间差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 免疫小鼠的 T 淋巴细胞增殖反应

Table 1 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice stimulated by recombinant S1 protein and PHA in vitro (SI)

Group	Stimulator	SI
pcDNA3.1(+)/S1	S1 antigen	3.05 $\pm$ 0.15
	PHA	1.05 $\pm$ 0.03
pcDNA3.1(+)	S1 antigen	1.12 $\pm$ 0.02
	PHA	1.01 $\pm$ 0.01
0.9%NS	S1 antigen	1.06 $\pm$ 0.02
	PHA	1.03 $\pm$ 0.01

## 3 讨论

SARS-CoV 为正链 RNA 病毒,成熟的病毒颗粒中一般存在 4 种结构蛋白:S 蛋白、N 蛋白、E 蛋白、M 蛋白<sup>[3]</sup>。S 蛋白,又名突起蛋白,含 1255 个氨基酸,是冠状病毒的主要抗原,包含许多中和性抗原表位,并结合敏感细胞受体,介导病毒包膜和细胞膜以及细胞之间的融合,刺激机体产生中和抗体和介导细胞免疫应答,是病毒诱发机体产生中和抗体及细胞免疫反应的重要抗原。在组织嗜性、细胞融合与毒力方面起重要作用<sup>[4]</sup>。S 蛋白有 4 个结构域,分别是一个胞质域、一个跨膜区、两个包膜外域(分别称为 S1 和 S2),靠近 N 端的球状部分为 S1 区,靠近 C 端的棒状部分为 S2 区,病毒通过 S1 与细胞受体结合,S2 与膜融合有关<sup>[5,6]</sup>。S1 区同宿主细胞上的特异性受体结合导致 S 蛋白构象改变,病毒侵入细胞。目前测定多株 SARS-CoV 的 S 蛋白氨基酸序列同源性极高,如 Tor2 株和 Urbani 株的 S 蛋白仅差一个氨基酸(A S)。相关软件预测冠状病毒 S 蛋白的二级结构与其它冠状病毒(如 HCoV-229E)的 S 蛋白具共同特征,即在其 N 端和 C 端具共同的基元结构,如 HCoV-229E、

MHV 和 TGEV 的 S 蛋白受体结合区均位于 N 端,并且大量研究已经证明 SARS-CoV S 蛋白 N 端为受体结合区<sup>[7]</sup>。

本研究用 ExPASy 软件综合分析 S 蛋白的抗原性、亲水性、可接近性、保守区、同源性、跨膜性及 -转角等参数后,选取其 22382bp ~ 23182bp 段为目的片段进行基因合成,并构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)/S1。核酸疫苗是将编码抗原蛋白的 DNA 直接注入动物体内,可模拟天然感染方式,启动针对该抗原的细胞和体液免疫;避免了制备纯化中某些可能破坏抗原活性的步骤,所以直接用编码目的抗原的真核表达载体来免疫机体更加切实可行。真核表达载体 pcDNA3.1(+ ) 分子量达 5.4kb,除受控于人巨细胞病毒(CMV)强启动子外,还包含真核宿主细胞表达重组基因所需要的其他元件,是一种高效率的质粒型真核表达载体,可使目的基因在哺乳动物体内很好的表达。

本研究中 SDS-PAGE 与 Western-Blotting 结果表明在 pcDNA3.1(+)/S1 转染的 Hela 细胞内表达了重组蛋白,而 pcDNA3.1(+ ) 转染组与空细胞对照组则没有相应蛋白表达。故将重组质粒肌注免疫正常 BALB/C 小鼠,免疫后小鼠一般状况良好,且用 SARS-CoV IgG 检测试剂盒测各个阶段小鼠体内抗 SARS-CoV IgG,发现初次免疫后 7d 小鼠即产生了抗 SARS-CoV IgG,且随免疫次数的增加和接种时间的延续,pcDNA3.1(+)/S1 免疫组与其它两组差异明显,抗体滴度达 1:2000,而 0.9%NS 组与 pcDNA3.1(+ ) 组分别为 1:100 和 1:250,说明该基因疫苗可诱导机体产生较强的体液免疫应答,产生特异性抗体抗 SARS-CoV IgG。S 蛋白是 SARS-CoV 表面刺突蛋白,其诱导产生的抗体一般可以中和病毒。

细胞介导的免疫反应是核酸疫苗诱导机体抵抗病毒攻击的又一个主要机制,T 淋巴细胞增殖反应是测定细胞免疫反应功能的综合性指标,在一定的程度上可以反映机体的特异性细胞免疫功能。本研究中 T 淋巴细胞增殖实验表明,pcDNA3.1(+)/S1 注射组细胞加入刺激物后,细胞成团生长,pET-22b/S1 重组蛋白刺激组较 PHA 刺激组细胞增殖明显活跃,

0.9%NS、pcDNA3.1(+ ) 免疫组细胞刺激后亦有增殖,但较实验组明显低,各组均数间差异具有显著意义;本研究中细胞因子 IFN- $\gamma$  检测结果表明,免疫后 pcDNA3.1(+)/S1 免疫组小鼠 IFN- $\gamma$  含量明显上升,为 184.5pg/mL,pcDNA3.1(+)/S1 免疫组 IFN- $\gamma$  含量约为 pcDNA3.1(+ ) 免疫组的 9 倍,0.9%NS 免疫组的 21 倍。以上结果说明该核酸疫苗可有效激活小鼠体内 TH1 淋巴细胞,诱导细胞免疫应答,通过细胞因子和细胞毒作用清除细胞内病毒。Th1 细胞主要参与细胞免疫应答及迟发性超敏反应的形成,在抗胞内病原体(病毒、细菌等)感染中起重要作用。SARS 患者细胞免疫力低下也是病毒得以长时间持续感染的原因之一,所以用免疫接种的方法来诱导和加强 S 蛋白的细胞免疫应答也有利于病毒清除。

本研究对 SARS-CoV S1 蛋白体外活性的测定及动物免疫实验表明,S1 蛋白是一种有效的免疫原,可以诱导较强的体液免疫和细胞免疫应答,对于 SARS 的特异性防治有潜在应用价值,可作为一种有应用前景的人用核酸疫苗进一步研究。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Ruan Y J, Wei C L, Ee L A, *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection[J]. *The Lancet*. 2003, 361(9371):1779-1785.
- [3] 李娟,万延民,许四宏,等. 5 株 SARS-CoV 部分基因序列比较分析[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2004, 24(5):400-403.
- [4] 凌世淦,宋晓国,胡巍,等. SARS 病毒多表位免疫原的研究[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28:6-8.
- [5] Yoo D W, Parker M D, Babiuk L A. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. [J] *Virology*, 1991, 180:395-399.
- [6] Sturman L S, Ricard C S, Holmes K V. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: Host-dependent differences in Proteolytic cleavage and cell fusion[J]. *J Virol*, 1985, 56:904-908.
- [7] 方宏清,陈惠鹏. 冠状病毒 S 蛋白的结构和功能[J]. *生物技术通讯*, 2003, 14:254-256.