

SARS 冠状病毒非结构蛋白 Nsp 的原核表达 *

刘家森^{1,3}, 陈淑红^{1,3}, 刘怀然¹, 孟庆文¹, 庞海^{2**}, 孔宪刚^{1**}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 清华大学医学院, 北京 100084; 3. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

Prokaryotic Expression of SARS Coronavirus Nonstructural Protein 9

LIU Jia-sen^{1,3}, CHEN Shu-hong^{1,3}, LIU Huai-ran¹, MENG Qing-wen¹, PANG Hai^{2**},
KONG Xian-gang^{1**}

(1. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, CAAS, Harbin, Heilongjiang 150001 China; 2. Medical College, Tsinghua University, Beijing 100084 China; 3. Veterinary Medicine College, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030 China)

Abstract: The gene of nonstructural protein 9 of SARS-coronavirus (SARS-CoV) was amplified using PCR from the product derived from reverse transcription of SARS-CoV genome RNA, and was inserted into the multiple cloning sites of the expression vector pGEX-6p-1. Recombinant strain induced with IPTG expressed the specific soluble protein. The nsp9 protein was harvested and purified by affinity chromatography and processed by prescission protease. Polyclonal serum against the nsp9 protein was raised in rabbit.

Key words: SARS coronavirus (SARS-CoV); Replicase; Expression

关键词: SARS 冠状病毒; 复制酶; 表达

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)05-0552-03

严重急性呼吸综合征病毒, 即 SARS 冠状病毒 ((Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV), 为具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组长 29~31kb。基因组从 5 到 3 端依次编码复制酶蛋白 (Rep)、刺突蛋白 (S)、囊膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核蛋白 (N) 以及其他一些辅助性蛋白^[1]。编码复制酶蛋白的基因, 从基因组 5 端起约占全长的 2/3 区域 (21.2kb), 在该区域的 nt13392-13398 存在保守的 UUUAAC 位点, 此位点含有 -1 位的核糖体翻译移框 (frameshift), 可引发自单一起始位点的蛋白翻译扩展, 即由 ORF1a 编码的 Pp1a (约 486kDa) 扩展为由 ORF1b 编码的 Pp1ab (约 790kDa), Pp1a 和 Pp1ab 共同组成 SARS-CoV 的复制酶蛋白复合体^[1,2]。预测该复合体可由其自身编码的木瓜水解蛋白酶 (papain-like

proteinase, PLPpro) 和 3C 样胰凝乳酶 (3C-like proteinase, 3CLpro) 水解处理产生 16 个成熟的复制酶蛋白 (亦非结构蛋白, Nonstructural protein, Nsp)^[3]。这些复制酶蛋白所具有的酶活性依次为: 木瓜水解蛋白酶、3C 样胰凝乳蛋白酶、RNA 依赖性聚合酶、解旋酶、3'-5' 外切核酸酶、内切核酸酶、2-核糖甲基转移酶^[4]。复制酶蛋白的合成是病毒在细胞中生命活动的开始, 复制酶蛋白复合体及其水解产物对于病毒基因组的复制、亚基因组的转录以及翻译后的调节起到重要作用。据推测 Nsp9 蛋白大小为 12kDa, 由 339bp 编码的 113 个氨基酸构成。本研究从 SARS-CoV (BJ01 株) 中扩增出 nsp9 基因全长片段, 并在大肠杆菌中获得了可溶性表达, 为探讨其在病毒复制、转录调控以及与细胞内蛋白质之间的作用打下基础。

收稿日期: 2005-04-04, 修回日期: 2005-05-23

* 基金项目: 黑龙江省科技厅攻关项目资助

作者简介: 刘家森 (1978-), 男, 黑龙江省籍, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 孔宪刚 (1955-), 男, 黑龙江省籍, 研究员。庞海 (1963-), 男, 吉林省籍, 教授。

Corresponding author. Tel: 0451-82725786-200, E-mail: xgkong@hvri.ac.cn & pangh@xtal.tsinghua.edu.cn

1 材料和方法

1.1 菌株、毒株和材料

大肠杆菌工程菌株 DH5⁺、BL21(DE3),表达载体 pGEX-6p-1 由本实验室保存,SARS-CoV 为 BJ01 株。所用 *Taq* 酶、限制性内切酶 *Bam*H 和 *Eco*R、IPTG 为 Takara 公司产品,AMV Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor 为 Invitrogen 公司产品,引物合成、DNA 核酸测序由上海生工生物工程公司完成;Glutathione sepharose 4B、preScission protease 为 Amersham biosciences 产品,弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品,其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 SARS-CoV nsp9 基因的克隆和表达载体构建

SARS-CoV (BJ01 株)的非结构蛋白 nsp9 的 cDNA 模板合成依常规方法在哈尔滨兽医研究所生物安全三级实验室进行,根据 BJ01 株基因组序列 (GenBank 登录号:A Y278488) 中的 nsp9 序列设计引物,上游引物加入 *Bam*H 酶切位点:5'-GCC GGA TCCAA TAA TGA ACTGA GTCCA -3',下游引物加入 *Eco*R 酶切位点:5'-CCGGAATTCTT ACTGAA GACGTACTGTA GC-3';下划线表示引入的酶切序列。PCR 扩增产物,经 *Bam*H 和 *Eco*R 酶切后连接到原核表达载体 pGEX-6p-1 中,用 PCR、双酶切和测序对重组质粒进行鉴定。

1.3 SARS-CoV Nsp9 表达和纯化

挑取重组菌 BL21 (DE3) pNSP9E,接种 LB 培养基培养,并以 IPTG 诱导表达。收集表达的菌体,以超声波裂解菌体后收集上清液,根据 Glutathione sepharose 4B 和 preScission protease 的产品说明对过滤后的上清液进行纯化和酶切。

1.4 多克隆抗血清的制备

选取体重 2kg 左右清洁级的哈白兔,用纯化 Nsp9 蛋白 1mL (0.5mg/mL) 与等量的弗氏完全佐剂混合进行首次免疫,以后每次免疫换成弗氏不完全佐剂,剂量与首次相同,免疫程序为:首免 14d 后进行二免,7d 后进行三免,7d 后采血处死,收集血清。以 Western-blotting 检测血清效价。

2 结果

2.1 ns p9 基因的克隆与鉴定

经 PCR 扩增得到一条在 250bp ~ 500bp 之间的特异片段,与预计结果 360bp 相一致。将扩增得到的 DNA 片段连接到表达载体 pGEX-6p-1 上,以 PCR 对重组质粒进行鉴定获得一条 360bp 的条带,

*Bam*H / *Eco*R 双酶切对重组质粒进行鉴定得到 4 900bp (载体) 和 360bp (目的片段) 两条带,将阳性质粒命名为 pNSP9E (图 1),阳性质粒的测序结果表明获得的 nsp9 重组表达载体序列正确无误。

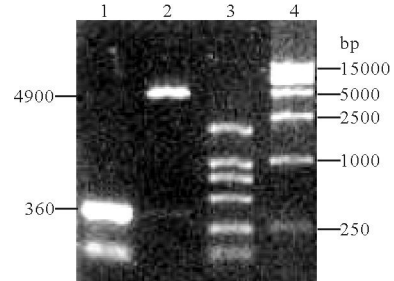


图 1 阳性克隆的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant vector

1, Amplified product by PCR; 2, Digested product by *Bam*H and *Eco*R; 3, DNA Marker DL2000; 4, DNA Marker DL15000

2.2 Nsp9 蛋白的表达和抗血清检测

IPTG 诱导重组菌 BL21 (DE3) pNSP9E 产生的表达产物,经 15% SDS-PAGE 分析,出现一条大小为 38kDa 的特异蛋白带,以可溶形式存在于上清液中,进一步的纯化和酶切后,分别获得了大小为 38kDa 的融合蛋白和 12kDa 的 Nsp9 蛋白 (图 2)。

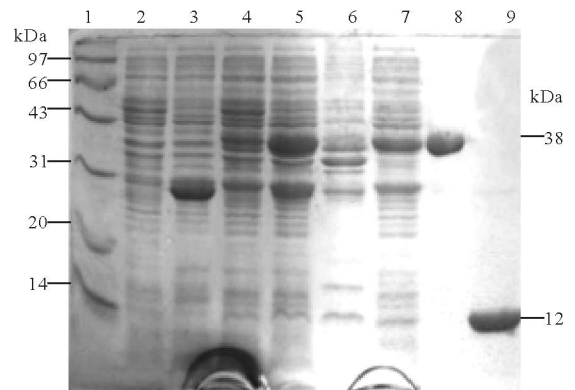


图 2 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of the expression product by SDS-PAGE

1, Protein maker; 2, BL21 (DE3) induced with IPTG; 3, BL21 (DE3) pGEX-6p-1 induced with IPTG; 4, BL21 (DE3) pNSP9E uninduced with IPTG; 5, BL21 (DE3) pNSP9E induced with IPTG; 6, Pellet of BL21 (DE3) pNSP9E induced with IPTG; 7, Supernatant of BL21 (DE3) pNSP9E induced with IPTG; 8, Product purified by Glutathione sepharose 4B; 9, nsp9 protein.

将实验兔免疫后血清作 1:1000 稀释、免疫前血清作 1:100 稀释,同时进行 Western-blotting 分析,表明免疫前血清不与免疫原 Nsp9 蛋白发生反应,免疫后血清与免疫原 Nsp9 蛋白产生良好的免疫反应,免疫结果良好 (图 3)。

3 讨论

目前研究人员已经从多个方面入手对 SARS-

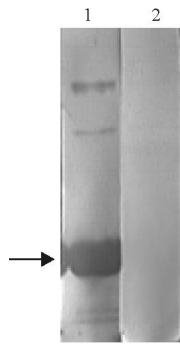


图 3 Western-blotting 检测抗 nsp9 血清

Fig. 3 Analysis of the serum anti-nsp9 by western blotting
1, Anti-nsp9 serum (1:1000 dilution); 2, Pre-immune serum (1:100 dilution)

CoV 复制酶蛋白进行研究,其中 Nsp9 是第一个获得晶体结构的蛋白^[5],晶体结构显示其以两个不对称的单体组成的二聚体形式存在,每个单体中 7 个折叠和 1 个螺旋结合紧凑,形成一个锥形的木桶结构。进一步的预测显示 Nsp9 具有结合 ssRNA 的能力,且此种结合是 RNA 序列非特异性结合^[6]。Geoff 等^[7]的实验证明当 RNA 的浓度一定时,随着 Nsp9 加入的量的增加,自由存在的 RNA 逐渐减少,而 RNA-蛋白复合物逐渐增加。Nsp9 在病毒复制和转录的过程中可能与新合成的核苷酸链结合,使其稳定并避免核酸酶的水解。Erik 等^[8]在 SARS-CoV 感染 Vero E6 细胞后 6h 内就可以检测到 Nsp9 的表达,Western-blotting 分析表明其大小在 12kDa 左右,与我们表达蛋白的大小相一致。免疫荧光显示 Nsp9 分布在细胞核周围以及细胞浆中的内质网和小泡中。Geoff 等的浮选分布实验表明 Nsp9 单独出现在水相中,不会与膜强烈结合,即不会是病毒复制转录复合体的膜锚定物。这与一般认为的病毒复制复合体都具有膜相关性的结论相反^[9]。nsp9 在病毒感染细胞后的起始阶段就有表达,表现出其对病毒生命活动的启动性作用,但其在

病毒生命活动中是如何参与基因组的转录,亚基因组的调控、翻译,以及细胞中何种物质与其作用参与病毒复制都还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 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, 300:1394-1399.
- [2] Marra M A, Jones S J, Astell C R, *et al.* The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. *Science*, 2003, 300:1399-1404.
- [3] Thiel V, Ivanov K A, Putics A, *et al.* Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression[J]. *J Gen Viol*, 2003, 84:2305-2315.
- [4] Snijder E J, Bredenbeek P J, Dobbe J C, *et al.* Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage [J]. *J Mol Biol*, 2003, 331: 991- 1004.
- [5] Campanacci V, Egloff M P, Longhi S, *et al.* Structural genomics of the SARS coronavirus: cloning, expression, crystallization and preliminary crystallographic study of the Nsp9 protein [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59: 1628-1631.
- [6] Egloff M P, Ferron F, Campanacci V, *et al.* The severe acute respiratory syndrome coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit in the RNA virus world [J]. *PNAS*, 2004, 101:3792-3796.
- [7] Sutton G, Fry E, Carter L, *et al.* The nsp9 replicase protein of SARS coronavirus, structure and functional insights [J]. *Structure*, 2004, 12:341-353.
- [8] Prentice E, McAuliffe J, Lu X T, *et al.* Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins[J]. *J Viol*, 2004, 78:9977-9986.
- [9] Brockway S M, Clay C T, Lu X T, *et al.* Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex associated with the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase [J]. *J Virol*, 2003, 77: 10515-10527.