

## SARS病毒S蛋白的原核表达与DNA疫苗的构建

严重急性呼吸综合征(SARS)的病原体为SARS冠状病毒[1]。其中S蛋白是病毒外壳组分,是SARS-CoV的主要表面抗原,也是病毒和宿主细胞受体结合及病毒诱发机体产生抗体或细胞免疫反应的重要因子。刺突(spike, S)蛋白属于I型膜蛋白,它是SARS-CoV结构蛋白中最大的,含1 255个氨基酸残基,相对分子质量为139 170 kD[2]。S蛋白前体在宿主的细胞质中合成以后会被切成两个部分S1和S2,其中S1形成成熟蛋白的球状部分,S2形成成熟蛋白的棒状部分。S1片段主要参与病毒与宿主细胞间的识别,S2片段藉跨膜区锚定于膜上,负责病毒膜与细胞膜的融合[3][4][5]。目前GenBank所收录的SARS病毒分离株的S蛋白的编码基因及氨基酸序列进行同源性分析,发现分离株S蛋白氨基酸突变率和编码碱基突变分别仅为0.23%和0.16%,是用来研制保护性疫苗的理想部位。进行多重比对显示,S蛋白的编码基因序列的S蛋白的特殊功能及其相对保守性为有效疫苗的开发奠定了很好的基础,可以作为疫苗研究的重要靶点[6]。

目前,在我国SARS感染后的免疫学诊断尚无完善的方法,细胞培养的抗原面临纯化困难和操作的危险性[7]。因此我们利用基因重组的方法,根据S1和S2的主要结构域[8][9]选取1~1 200、2 565~3 765 bp DNA,分别在大肠杆菌中表达了 $rS_a$ 、 $rS_b$ 两段重组蛋白,对S蛋白的免疫原性进行研究。实验证明我们所表达的分段蛋白可以在原核系统中高效表达,并能与SARS确诊病人恢复期血清发生特异性抗原抗体反应。人类基因组南方中心根据SARS-CoV S蛋白的分析表明S蛋白的抗原表位比较多且分散[7],作为生产疫苗的首选抗原蛋白,由于其基因组较大,因此我们构建含有全长S基因的真核载体重组质粒,作为DNA疫苗,免疫小鼠,实验证明可以产生SARS-CoV S蛋白抗血清,这为进一步SARS-CoV DNA疫苗的研制提供了一定的科学依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

大肠杆菌BL21(DE3)和TG-1为本实验室保存。原核表达载体pET-15b购自Novagen公司,分泌型真核表达载体pSecTagB购自Invitrogen公司。S全长基因由本实验室通过RT-PCR克隆入pMD18-T载体命名为pMD18-TS,S基因原始基因序列来自Gen-Bank(登录号:AY351680)。ExTaq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性内切酶、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Ni<sup>2+</sup>亲和胶购于Amer-sham 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;SPF级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SARS确诊患者,其临床检测符合《传染性非典型肺炎诊疗方案》,经由华大SARS-CoV IgG抗体检测试剂盒检测证实为SARS-CoV IgG强阳性。

6条引物序列如下:

S1引物序列

Psa:5'-GGCGCATATGTTTATTTTCTTATTATTCTTACT-3'

Ps<sub>b</sub>: 5' -GGCGGGATCCTTATCTGGCGCTATTTGTCTTACATC-3'

S2引物序列

Psd: 5' -GGCGGGATCCTTATGTGTAATGTAATTTGACACC-3'

Psc: 5' -GGCGCATATGGATGATATGATTGCTGCCTAC-3'

S全长引物序列

Pse: 5' -CGCGGCCAGCCGGCCTTTATTTTCTTATTATTCTTACTC TCAC-3'

Psf: 5' -CGCGGGCCTGTGTAATGTAATTTGACACCCTT-3'

## 1.2 方法

1.2.1 重组原核表达载体的构建及筛选 (1) 重组质粒pETS<sub>a</sub>的构建: 以Ps<sub>a</sub>/Ps<sub>b</sub>作引物, 以含S全长基因的pMD18-TS质粒为模板扩增片段S<sub>a</sub>(碱基1~1 200), 电泳回收PCR产物, 将得到的S<sub>a</sub>片段和载体pET-15b分别用NdeI/BamHI双酶切, 电泳回收后将载体和S<sub>a</sub>连接, 即得到重组质粒pETS<sub>a</sub>, 其编码的相应重组蛋白称为rS<sub>a</sub>。将重组质粒pETS<sub>a</sub>转化入大肠杆菌TG-1提取质粒, 通过酶切电泳图谱筛选阳性克隆。酶切、回收、连接及转化的具体操作均参照文献[10]进行。(2) 重组质粒 pETS<sub>b</sub>的构建: 以Psc和Psd作为引物, 以含S全长基因的pMD18-TS质粒为模板扩增片段S<sub>b</sub>(碱基2 5453 765), 其余同pETS<sub>a</sub>的构建。将得到的阳性克隆命名为pETS<sub>b</sub>, 其编码的相应蛋白称为rS<sub>b</sub>。

1.2.2 重组蛋白(rS<sub>a</sub>、rS<sub>b</sub>)的原核表达 将重组质粒转化进BL21(DE3), 挑取阳性单菌落接种于LB液体培养基中(含Amp100 mg/L), 37 °C过夜培养, 按1:50体积比接种于LB培养基中, 培养至D(λ)≈0.6, 加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导表达3 h后离心收获菌体, 加入PBS (pH7.2~7.4)悬浮后, 超声波破碎细胞, 将破碎后的菌液以10 000 r/min离心, 分别收集上清和沉淀作12% SDS-PAGE电泳, 观察电泳结果, 以上操作均参照文献 [10]。

1.2.3 重组蛋白的纯化 Ni<sup>2+</sup>亲和纯化柱采用Amer-sham 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再作SDS-PAGE电泳, 以验证纯度。

1.2.4 DNA疫苗的构建 以Pse/ Psf作引物, 以含S基因的pMD 18-TS质粒为模板扩增S基因, 电泳胶回收, 分别用SfiI/ApaI双酶切片段和载体pSecTagB, 电泳胶回收后将载体和片段连接, 然后将连接产物转化入TG-1感受态细胞, 挑取单菌落培养, 抽提质粒, 进行双酶切和PCR鉴定, 得到的阳性克隆质粒命名为pSecS。

1.2.5 DNA疫苗的免疫 从阳性克隆的平板上挑取单菌落大量培养, 然后用试剂盒大量抽提质粒, 将质粒溶解于PBS (pH7.2)中使其终浓度约1μg/ml。BALB/c小鼠分为两组(每组4只)。在免疫小鼠前3 d给小鼠大腿肌肉注射盐酸普鲁卡因(100μl/只), 3 d后在同一位置肌肉注射重组质粒pSecS(100μl/只), 每隔两周注射1次, 共免疫3次[11]。另外一组小鼠以同样的方法注射pSecTagB, 作为空白对照组。

1.2.6 酶联免疫ELISA检测 分别用纯化的蛋白rS<sub>a</sub>和rS<sub>b</sub>以1μg/孔铺板, 4 °C包被过夜, 用1%的BSA 37 °C封闭2 h后, 分别以免疫鼠血清和SARS病人血清(1:100, 用1%BSA稀释)作为第一抗体加入, 37 °C孵育1 h, 然后, 分别加入1:1 000稀释的HRP羊抗鼠二抗和羊抗人二抗, 37 °C孵育1 h。每步均用PB-ST (PBS+Tween 20)洗板; 最后加入含TMB的底物缓冲液, 避光作用5 min后, 每孔加入50μl浓度为2 mol/L的硫酸终止反应; 在450 nm下测定光吸收值。阴性抗原对照孔采用1%的BSA代替融合蛋白包被ELISA板; 阴性血清对照孔分别加入免疫pSecTagB的鼠血清和正常人血清; 阳性血清对照孔加入SARS确诊病人的恢复期血清。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。以上ELISA检测均做4次平行实验。

## 2 结果

### 2.1 重组原核表达质粒pETS<sub>a</sub>、pETS<sub>b</sub>和真核DNA疫苗pSecS的构建

三个重组表达载体均构建成功。其中S<sub>a</sub>基因片段大小1.2 kb, S<sub>b</sub>片段大小为1.22 kb。原核表达载体

pET-15b以及真核载体pSecTagB的大小分别为5.7 kb和5.2 kb。所构建的重组质粒pETS<sub>a</sub>、pETS<sub>b</sub>、pSecS分别经双酶切和PCR验证，证明它们均正确克隆在表达载体中，pETS<sub>a</sub>、pETS<sub>b</sub>、pSecS双酶切的结果见(图1)。

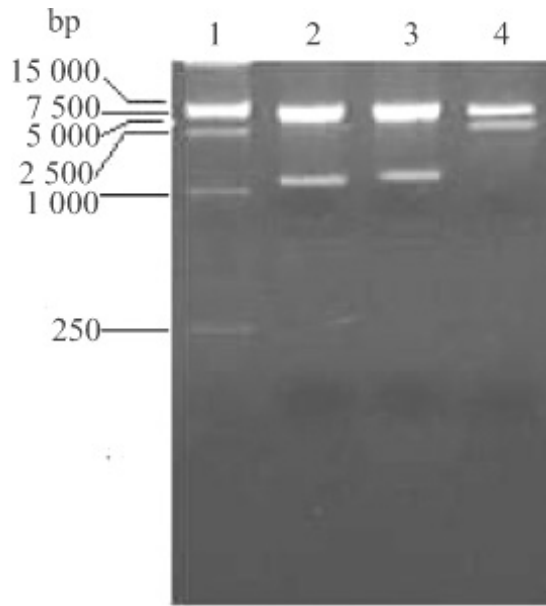


图1 重组质粒pETS<sub>a</sub>、pETS<sub>b</sub>、pSecS双酶切后的电泳图谱

Fig.1 Restriction enzyme analysis of the recombinant plasmid pETS<sub>a</sub>, pETS<sub>b</sub> and pSecS  
Lane 1:  $\lambda$ DNA /EcoR I+Hind III; Lane 2: pETS<sub>a</sub> digested by NdeI and BamHI; Lane 3: pETS<sub>b</sub> digested by NdeI and BamHI; Lane 4: pSecS digested by SfiI and ApaI

## 2.2 重组蛋白的表达及纯化

含重组质粒(pETS<sub>a</sub>和pETS<sub>b</sub>)的E. coli BL21(DE3)，经IPTG诱导和SDS-PAGE电泳后，均在约46 kDa处出现一条很浓的蛋白带，与两个分段重组蛋白的理论相对分子质量吻合，提示这说明两段重组蛋白在原核表达载体pET-15b中已得到高效表达。用超声波破碎菌体，高速离心后取上清和沉淀做12%的SDS-PAGE电泳，发现重组蛋白均在上清中出现，故融合蛋白为可溶性表达(图2)。两个重组蛋白均在N端融合了6个组氨酸，经Ni<sup>2+</sup>亲和胶柱纯化后可去除了绝大部分菌体杂蛋白(图2)。

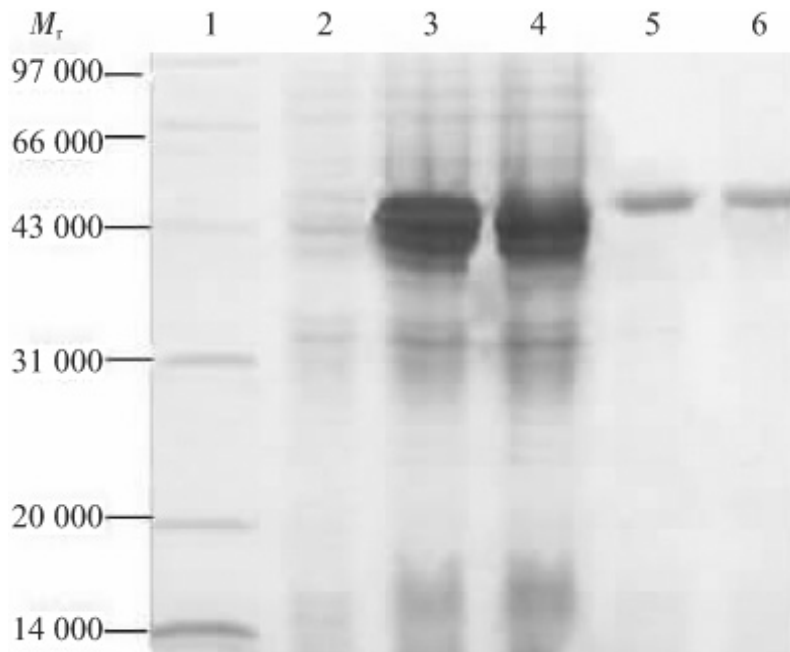


图2 重组蛋白的SDS-PAGE分析

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

### 2.3 重组蛋白的酶联免疫(ELISA)检测

利用纯化的rS<sub>a</sub>和rS<sub>b</sub>蛋白作为抗原,采用SARS确诊病人恢复期血清和免疫pSecS后的鼠血清进行ELISA检测,结果表明重组蛋白能与SARS病人血清和鼠血清发生特异性的抗原抗体反应,同时用北京华大公司生产的试剂盒(厂商标明为全病毒包被)进行比较试验(表1)。以下数值均为4次实验的平均值。

表 1 以 rS<sub>a</sub>、rS<sub>b</sub> 作为抗原检测 SARS 病人血清和鼠血清中抗 SARS-CoV IgG ( $\bar{x}\pm s$ , 1:100 diluted)

**Tab.1 Detection of anti-SARS-CoV IgG in sera of SARS patients and mice immunized with pSecS (Mean±SD, 1:100 diluted)**

Antigen	SARS patients Normal subjects pSecS (mice) pSecTagB (mice)			
	rS <sub>a</sub>	1.701±0.14	0.246±0.09	1.046±0.16
rS <sub>b</sub>	1.572±0.11	0.252±0.08	0.901± 0.13	0.195±0.11
*SARS-CoV	2.670±0.16	0.160±0.13	1.573±0.15	0.429±0.09
1% BSA	0.075±0.06	0.052±0.05	0.093±0.05	0.081±0.04

### 3 讨论

本研究采用分段表达的形式在大肠杆菌中表达了S蛋白S1、S2功能域的主要部分rSa和rSb。为了验证这两段重组蛋白的免疫原性,将这两段重组蛋白分别作为抗原与SARS确诊病人血清和免疫了DNA疫苗的鼠血清进行ELISA检测,发现这两个重组蛋白都可以与SARS病人血清发生特异性反应,这说明大肠杆菌表达的分段重组S蛋白具有相似SARS-CoV S蛋白的抗原性,有可能作为检测SARS的抗原组分来使用。

本研究中首次使用了分泌型真核表达载体pSec-TagB来构建S基因DNA疫苗。小鼠抗血清以1:100稀释后仍能与灭活的天然SARS全病毒发生较强的特异性反应,与pcDNA3.1相比,用分泌型真核表达载体(pSecTagB)构建的SARS病毒4个主要结构蛋白基因的DNA疫苗刺激机体产生抗血清的能力较强(另文发表)。这提示所构建的S-DNA疫苗能够在小鼠机体中表达出类似天然状态的SARS病毒抗原蛋白,进而产生了针对 SARS-CoV S蛋白的特异性抗体。同时免疫小鼠产生的抗血清也能与大肠杆菌表达的重组蛋白发生特异性的反应,这也间接说明所表达的分段重组S分段蛋白保留了天然状态S蛋白的大多数特异抗原表位。由于此真核表达载体为分泌型表达载体,它有可能使真核细胞内表达的蛋白更容易分泌至胞外进入血液刺激淋巴细胞产生免疫反应。这为DNA疫苗制备提供了一个新的思路和选择,但人体对于SARS冠状病毒的免疫应答机制以及刺突蛋白对免疫应答的影响尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada [J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1995-2005.
- [2] Liu SQ, GuoT, Ji XL, et al. Bioinformatics of SARS-CoV Proteomics and its

Relationship in Evolution[J]. Chin Sci Bull, 2003, 48(13):1359-68.

[3] Wang CZ, Qi ZH. The biological characteristics of SARS virus and its related coronavirus[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, 35(6):495-502.

[4] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis[J]. Virology, 2001, 279(2): 371-4.

[5] Popova R, Zhang X. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection[J]. Virology, 2002, 294(1): 222-36.

[6] Walgate R. SARS vaccine race: US and European groups moving forward, but WHO would rather put SARS "back in the box", Available May 2 at <http://www.biomedcentral.com/news/20030502/03>

[7] Yi Y, Duan SM, Zhang MC, et al. Cloning and expression of SARS coronavirus spike gene fragment and its application[J]. Chin J Virol, 2003, 19(3): 267-8.

[8] Ruan YJ, Wei CL, Ee LA, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. The Lancet, 2003, Available May 9 at <http://image.thelancet.com/extras/03art4454web.pdf>

[9] Ye X, Meng X, Dong JB, et al. Current research on SARS coronavirus vaccine[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, 30(3): 331-4.

[10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989. 332.

[11] Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, et al. DNA immunization: mechanistic studies [J]. Vaccine, 1999, 17(13-14): 1612-9.

#### 参考文献:

[1] Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada [J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1995-2005.

[2] Liu SQ, Guo T, Ji XL, et al. Bioinformatics of SARS-CoV Proteomics and its Relationship in Evolution[J]. Chin Sci Bull, 2003, 48(13):1359-68.

[3] Wang CZ, Qi ZH. The biological characteristics of SARS virus and its related coronavirus[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, 35(6):495-502.

[4] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis[J]. Virology, 2001, 279(2): 371-4.

[5] Popova R, Zhang X. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection[J]. Virology, 2002, 294(1): 222-36.

[6] Walgate R. SARS vaccine race: US and European groups moving forward, but WHO would rather put SARS "back in the box", Available May 2 at <http://www.biomedcentral.com/news/20030502/03>

[7] Yi Y, Duan SM, Zhang MC, et al. Cloning and expression of SARS coronavirus spike gene fragment and its application[J]. Chin J Virol, 2003, 19(3): 267-8.

[8] Ruan YJ, Wei CL, Ee LA, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. The Lancet, 2003, Available May 9 at <http://image.thelancet.com/extras/03art4454web.pdf>

[9] Ye X, Meng X, Dong JB, et al. Current research on SARS coron-avirus vaccine[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, 30(3): 331-4.

[10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning: a lab-oratory manual[M]. 2 nd. New York: Cold Spring Laboratory press, 1989. 332.

[11] Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, et al. DNA immunization: mMechanistic studies [J]. Vaccine, 1999, 17(13-14): 1612-9.

---

[回结果列表](#)