

SARS 冠状病毒刺突蛋白在裂殖酵母中的表达

Expression of SARS Spike Gene in *Schizomycete pombe*

吴朝霞^{1,3}, 郑文岭^{1,3*}, 张 宝², 师永霞², 马文丽^{2*}

WU Zhao-Xia^{1,3}, ZHENG Wen-Ling^{1,3*}, ZHANG Bao², SHI Yong-Xia² and MA Wen-Li^{2*}

1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640

2. 南方医科大学基因工程研究所, 广州 510515

3. 华南基因组研究中心, 广州 510860

1. College of Bioscience and Engineer, Southern China University of Science and Technology, GuangZhou 510640, China

2. Institute of Molecular Biology, Nanfang Medical University, GuangZhou 510515, China

3. Southern China Genomics Research Center, Guangzhou 510860, China

摘 要 根据 SARS 冠状病毒 S 蛋白主要抗原表位的分析, 将 S 蛋白基因扩增成大小为 800 bp ~ 1000 bp 的 5 个片段, 分别与裂殖酵母载体 pNMT1 连接, 经电穿孔转化 TCPI 菌株, 得到诱导表达 5 个片段的裂殖酵母菌株。对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明, S 基因 5 个片段在裂殖酵母中分别得到不同程度的表达, 为进一步研究新一代 SARS 疫苗提供了材料。

关键词 SARS, 刺突蛋白, 裂殖酵母, 表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0638-04

Abstract The viral spike protein is the main surface antigen of the coronavirus, and it could be useful in the research of clinical diagnosis, SARS vaccine and the structure biology. According to the analysis of the main antigen of the SARS spike protein, 5 fragments of the whole spike gene were cloned, and ligated to the vector pNMT1. Through electroporation transformation to TCPI, the recombinant *S. pombe* strains capable of expressing the 5 fragments were constructed. SDS-PAGE or Western blot analysis of the induced expression products demonstrated that the 5 recombinant proteins were expressed in the fission yeast respectively.

Key words SARS, spike protein, *Schizomycete pombe*, expression

非典型肺炎, 又称重症急性呼吸窘迫综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS), 是 2002 年底开始在全球范围内爆发的一种新的传染性极强的呼吸系统传染病, 最终确认引起 SARS 的病原体是一种新的冠状病毒, SARS 冠状病毒(SARS coronavirus SARS-Cov)^[1]。

SARS-CoV 病毒包膜主要包括三种糖蛋白, 其中 S 蛋白

是冠状病毒的主要的抗原蛋白。S 蛋白是一种膜蛋白, 由 1256 个氨基酸组成, 质量 180 kD, 大部分在外部, 还有跨膜区, 是包膜的棒-球形的糖蛋白, 它在病毒与宿主细胞表面受体结合及介导膜融合进入细胞的过程中起关键性作用, S 蛋白与病毒的致病力的关系最为密切, 可以诱导机体产生中和抗体和细胞毒 T 淋巴细胞反应^[2,3]。

Received: December 30, 2004; Accepted: April 1, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China(No.3988044) and the Key Technology Projects of Guangzhou (No.1999-Z005-001).

* Corresponding author. Tel 86-20-61648210 ;E-mail :wenling@fimmu.com , wenli@fimmu.com

国家自然科学基金资助项目(No.3988044)和广州市重大科技项目(No.1999-Z005-001) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

制备 SARS 疫苗有灭活疫苗、减毒疫苗、重组疫苗、DNA 疫苗等。目前我国主要研制 SARS 病毒灭活疫苗,并且已获准进入 I 期临床研究。更有吸引力、更简单的途径可能是重组亚单位疫苗,主要靶点是 S 基因^[4,5]。

裂殖酵母与更高等的真核细胞有许多相似的性质,可以看作是哺乳动物细胞类似特性的一种独特的酵母,其基因组测序已完成,使得裂殖酵母在分子生物学研究中成为一种真核模型,在外源基因的表达方面具有较好的前景。用裂殖酵母作为宿主直到最近才引起重视,国外目前利用裂殖酵母成功表达外源蛋白的例子很多,但国内研究报道极少^[6,7]。我们根据 SARS 的 S 蛋白抗原表位分析^[3,8],利用生物软件设计 5 对引物扩增除信号肽部分和跨核部分外的基因片段,分别为 43 bp-903 bp, 808 bp-1674 bp, 1591 bp-2538 bp, 2440 bp-3399 bp, 2734 bp-3588 bp, 得到含 S 蛋白主要抗原表位的 5 个片段,在裂殖酵母表达系统中进行了稳定表达,为开发 SARS 疫苗打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与培养基:裂殖酵母表达质粒 pNMT1-TOPO、裂殖酵母宿主菌 TCP1、裂殖酵母表达培养基 EMM 均购自 Invitrogen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; SARS 的 S 全长基因、大肠杆菌宿主细胞 TOP10 和 DH5 α 由本实验室保存。裂殖酵母完全培养基 YES 含 0.5% yeast extract, 3.0% glucose, 225 mg/L adenine/histidine/leucine/uracil/lysine hydrochloride; 裂殖酵母基本培养基 EMM 含 3.2% EMM, EMM + T 为含 10 μ mol/L 硫胺(维生素 B1)的 EMM, EMM + LT 为含 10 μ mol/L 硫胺、0.225g/L 亮氨酸的 EMM。培养 *Escherichia coli* 时用 LB 培养基 [0.5% yeast extract, 1.0% tryptone, 1.0% NaCl, pH 7.0]。

1.1.2 试剂:PCR 引物由南方医科大学合成;小鼠源抗 V5 抗体购自 Invitrogen 公司,含 HRP 标记的羊抗鼠二抗的 Western blot 检测试剂盒购自博士德公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海申能博彩公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 TaKaRa 公司;其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 S 蛋白基因的扩增及测序:根据 S 蛋白的抗原表位分析和软件 primer premier 5.0 设计 5 对引物,以 S 全长基因为模板扩增 5 个片段,PCR 引物设计中在目的基因上游添加了起始密码子,得到 5 个片段分别为 S1、S2、S3、S4、S5。扩增引物分别如表 1。

S1、S2、S3 片段 PCR 循环反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 59 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 共 30 个循环后,于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, S4、S5 片段扩增将循环体系中的退火温度变为 55 $^{\circ}$ C,其它条件不变。用 1% 琼脂糖凝胶(含 EB)电泳观察扩增结果。将扩增的 5 个片段分别与 pMD18-T 载体连接并测序鉴定,该测序工作由南方医科大学完成。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence
S1 (43-903 bp)	5' ATG GACCTTGACCGGTGCACCA 3' 5' CTGGTAAATTCCTTTGTCAATC 3'
S2 (808-1674 bp)	5' ATG GGTACAATCACAGATGCTG 3' 5' GAAATCAGAAACATCACGGCC 3'
S3 (1591-2538 bp)	5' ATG GGACTCACTGGTACTGGTGT 3' 5' CAGAGTGGCAACACTGTAAG 3'
S4 (2440-3399bp)	5' ATG GGCTTCATGAAGCAAT 3' 5' CTCCTCTTTGAATGAGTCAAG 3'
S5 (2734-3588bp)	5' ATG GCGATTAGTCAAATCAAGA 3' 5' CCAAGGCCATTTAATATATTGC3'

1.2.2 重组表达载体的构建:将 5 个片段的 PCR 产物切胶纯化后直接与裂殖酵母的表达载体 pNMT1 相连,进行 TA 克隆,转化大肠杆菌 TOP10。挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定外源基因的插入方向,PCR 引物为载体测序引物的上游引物与目的片段下游引物或载体测序引物的下游引物与目的片段上游引物,PCR 扩增反应条件同上(1.2.1)。取阳性克隆子于含 60 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养,提取质粒,并进一步进行测序鉴定。

1.2.3 目的基因的转化与诱导表达:将测序鉴定的含目的基因的重组质粒电转化裂殖酵母菌 TCP1,铺板于含 10 μ mol/L 硫胺的 EMM 培养基(EMM + T),挑取单克隆培养,并提取酵母质粒进行 PCR 鉴定,PCR 引物分别为目的片段上下游引物,扩增条件同 1.2.1。酵母质粒提取方法:在含 1.5mL EMM + T 培养基的 EP 管中培养单克隆细胞至 OD₆₀₀ 约为 1,收集细胞并倒出上清液,加入 200 μ L 的酵母裂解液(2% Triton X-100, 1% SDS, 100mmol/L NaCl, 10mol/L Tris-HCl pH8.0, 1mol/L Na₂EDTA), 200 μ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 0.3g 酸洗玻璃珠,振荡 2min 并离心 5min,取上面水层到新的 Eppendorf 管,用 70% 乙醇沉淀,最后溶于 10 μ L 灭菌水中。取裂殖酵母重组的阳性克隆子于 EMM + T 培养基中 30 $^{\circ}$ C 过夜培养,然后用不含硫胺的 EMM 培养基洗涤并转入 EMM 培养基中继续培养,诱导 16~24h。

1.2.4 目的蛋白的检测:用玻璃珠破碎法提取裂殖酵母总蛋白,溶于 TE 缓冲液中,煮沸 5min 后用含 5% 聚丙烯酰胺的浓缩胶、10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。用于 Western blot 检测的鼠源性的抗 V5 抗原表位抗体为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,对目的蛋白分别进一步进行免疫检测,转膜后切割 Marker 用 1 \times 丽春红染液染 5min,与免疫检测结果对照。

2 结果

2.1 目的基因的获取及鉴定

以 SARS-CoV 的 S 全基因为模板,用 5 对引物 PCR 扩增后分别得到 S1、S2、S3、S4、S5 五个片段,与预期的结果一致(见图 1)。测序的结果也与已知发布的序列一致。

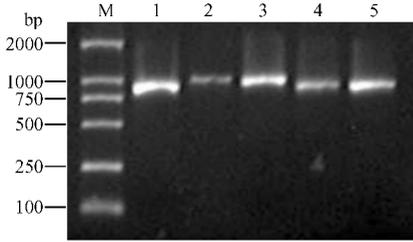


图1 目的片段的 PCR 结果示意图

Fig. 1 PCR product of S gene

M: DNA marker DL2000; 1: S5 fragment; 2: S4 fragment; 3: S3 fragment; 4: S2 fragment; 5: S1 fragment.

2.2 重组表达质粒的构建

用菌落 PCR 鉴定外源片段的正反向插入, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 2。培养正向插入的克隆子 (如图 2 中约含 1000 bp 的条带), 分别提取质粒电泳并进一步测序鉴定, 测序结果与已发布的序列一致, 分别称为 pNMT1-S1、pNMT1-S2、pNMT1-S3、pNMT1-S4、pNMT1-S5。

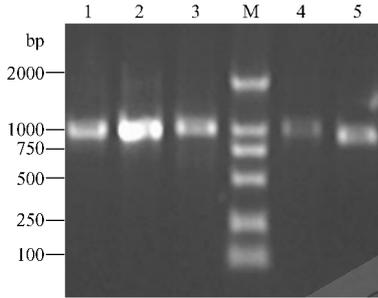


图2 重组质粒 PCR 鉴定示意图

Fig. 2 PCR of the recombinant plasmid

M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of pNMT1-S1; 2: PCR product of pNMT1-S2; 3: PCR product of pNMT1-S3; 4: PCR product of pNMT1-S4; 5: PCR product of pNMT1-S5.

2.3 酵母克隆子鉴定

将鉴定的重组质粒 pNMT1-S1、pNMT1-S2、pNMT1-S3、pNMT1-S4、pNMT1-S5 分别电转化裂殖酵母 TCP1 后, 提取酵母质粒 PCR 鉴定酵母阳性克隆子的电泳图见图 3, 所挑取克隆子鉴定均为阳性, 证实重组载体已转化到裂殖酵母中, 得到酵母重组子 TCP1-pNMT1-S1、TCP1-pNMT1-S2、TCP1-pNMT1-S3、TCP1-pNMT1-S4、TCP1-pNMT1-S5。

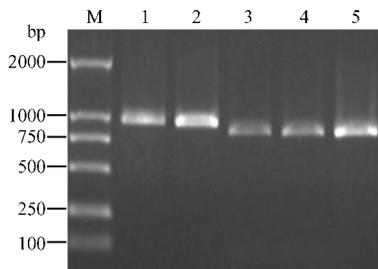


图3 酵母质粒 PCR 鉴定图

Fig. 3 PCR product of yeast plasmid

M: DNA marker 2000; 1: PCR product of TCP1-pNMT1-S3; 2: PCR product of TCP1-pNMT1-S4; 3: PCR product of TCP1-pNMT1-S1; 4: PCR product of TCP1-pNMT1-S2; 5: PCR product of TCP1-pNMT1-S5.

2.4 SDS-PAGE

提取诱导后的酵母总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳 (如图 4)。其中 TCP1-pNMT1-S1 和 TCP1-pNMT1-S5 在约 30 kD 处有明显增强的条带 (图 4 中箭头所示), 而且诱导时间不同蛋白表达量也不同。TCP1-pNMT1-S2、TCP1-pNMT1-S3、TCP1-pNMT1-S4 蛋白电泳目的蛋白条带不明显, 可能是表达量不高, 需进一步用免疫检测。

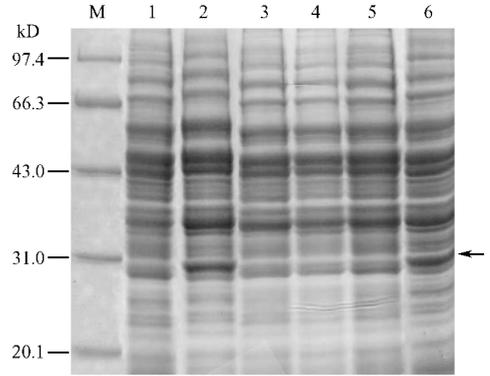


图4 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS PAGE analysis of recombinant

proteins induced for 16 hours

M: protein marker; 1: the blank TCP1 induced; 2: TCP1-pNMT1-S1; 3: TCP1-pNMT1-S2; 4: TCP1-pNMT1-S3; 5: TCP1-pNMT1-S4; 6: TCP1-pNMT1-S5.

2.5 Western blot

将提取的酵母总蛋白按 Western blot 检测试剂盒方法操作, 免疫检测结果如图 5。其中 TCP1-pNMT1-S1 和 TCP1-pNMT1-S5 在约 30 kD 处有明显的特异性条带, TCP1-pNMT1-S2 在约 34 kD 处有特异性条带, TCP1-pNMT1-S3 和 TCP1-pNMT1-S4 在约 39 kD 处有特异性条带。

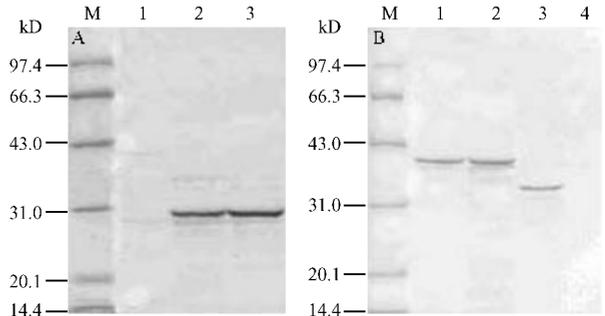


图5 S1、S2、S3、S4 和 S5 蛋白 Western blot 图

Fig. 5 Western blot analysis of TCP1-pNMT1-S1, TCP1-pNMT1-S2, TCP1-pNMT1-S3, TCP1-pNMT1-S4 and TCP1-pNMT1-S5

A. M: protein marker; 1: blank TCP1; 2: TCP1-pNMT1-S1; 3: TCP1-pNMT1-S5.

B. M: protein marker; 1: TCP1-pNMT1-S4; 2: TCP1-pNMT1-S3; 3: TCP1-pNMT1-S2; 4: blank TCP1.

3 讨论

裂殖酵母是一种新型酵母,其培养方法和分子生物学操作与其它酵母相似,裂殖酵母基因组测序 2002 年已完成,其许多基因的功能已鉴定。裂殖酵母的许多性质同哺乳动物细胞类似,不仅是研究高等真核生物一种很好模型,而且其作为外源基因表达系统,具有各种翻译后修饰功能,表达的蛋白接近其天然结构^[7]。裂殖酵母表达系统越来越受到人们的重视。本实验选择的表达载体 pNMT1 为去硫胺诱导的 nmt1 启动子,该启动子在裂殖酵母表达载体中应用最广泛,诱导活性强^[9],而且利用拓扑异构酶进行 TA 克隆,既可在大肠杆菌中扩增又可转化裂殖酵母,操作方便。因裂殖酵母菌株是亮氨酸(Leu⁻)营养缺陷型,需在补充有 Leu 的培养基中才能生长,而重组质粒载体含有 Leu 基因,转化后可以在缺乏 Leu 的培养基上生长,可以初步筛选阳性克隆子。该载体目的基因后面还有一个 V5 抗原表位基因和 6 个 His 标签,有利于表达蛋白的检测和纯化。

SARS 冠状病毒的 S 蛋白全长 1256 个氨基酸,含有信号肽(1-13 aa)和跨膜部分(1219-1256aa)。S 蛋白是糖基化蛋白,而且糖基化在其生物学活性中起重要作用^[2,3]。目前报道的 S 蛋白的表达多为原核系统表达,缺乏糖基化作用。因 S 基因全长较大,本实验根据北京大学生物信息中心对 S 蛋白的分析结果,将 S 蛋白基因克隆为有部分重叠的 5 个片段,利用裂殖酵母进行表达。

从本实验表达的 5 个蛋白 SDS-PAGE 图中可以看出,S1 和 S5 蛋白(见图 4)的表达量较明显,表达的蛋白为 30 kD 左右。但不同的诱导时间,影响了蛋白的表达量,在去硫胺后诱导 16 h 外源蛋白得到最大表达,延长时间表达量反而降低,Western blot 分析进一步证实了此两蛋白的表达。S1、S3、S4 蛋白虽然表达量不高,SDS-PAGE 没有明显的增强条带,但通过 Western blot 分析(见图 5 B),说明此三个蛋白在裂殖酵母中已表达,其中 S2 蛋白约为 34kD,S3、S4 蛋白约为 39 kD。S2 基

因与 S1、S5 基因片段大小差不多,但 S2 蛋白要大 4 kD 左右,可能是 S2 蛋白糖基化程度不同,其原因有待进一步研究。

本实验成功地实现了 SARS 的 S 蛋白主要抗原表位片段的真核表达,有利于 S 蛋白生物学和 SARS 疫苗研究,也为对裂殖酵母表达系统的研究打下基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, www.nejm.org/April 10 2003/10 1056/NEJ Moa 020781
- [2] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, **279**(2): 371 - 374
- [3] Xiao X, Dimitrov DS. The SARS-CoV S glycoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61**(19 - 20): 2428 - 2430
- [4] Denison MR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis, disease and vaccines. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, **23**(11 Suppl): 207 - 214
- [5] Viret JF, Gluck Moser C. Development of a SARS vaccine: an industrial perspective on the global race against a global disease. *Vaccine*, 2003, **21**(4): 465 - 467
- [6] Lu Quinn, Bauer Joho C, Greener Alan. Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins. *Gene*, 1997, **200**(1 - 2): 135 - 144
- [7] Yuko Giga-Hama, Hiromichi Kumagai. Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, **30**(3): 235 - 244
- [8] Wang YD(王月丹), Xie Y(谢雍), Chen WF(陈慰峰). Immunoinformatic analysis for the epitopes on SARS virus surface protein. *Journal of Peking University(Health Sciences)*, 2003, **35**(z1): 70 - 71
- [9] Moreno MB, Duran A, Ribas JC. A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast*, 2000, **16**(9): 861 - 872