

利用昆虫杆状病毒表达 SARS 冠状病毒的 刺突蛋白和膜蛋白

贾世海 周 博 吴 峻 李木旺 潘敏慧¹ 鲁 成¹ 苗雪霞 黄勇平*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032;

¹ 西南大学, 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要 SARS 冠状病毒是人的严重急性呼吸综合征的病原体。对其他种类冠状病毒的研究结果显示, 刺突蛋白(S 蛋白)和膜蛋白(M 蛋白)是病毒主要的结构蛋白。重组 M 蛋白和 S 蛋白可被用来作为抗原检测冠状病毒的感染和制备疫苗。这两个蛋白质分别被克隆并重组到昆虫杆状病毒基因组中, 利用重组杆状病毒感染昆虫细胞来表达重组 M 蛋白和 S 蛋白, 并对 M 蛋白进行了细胞内定位, 融合蛋白的绿色荧光暗示了该蛋白质定位在细胞膜上。

关键词 严重急性呼吸综合征(SARS); 冠状病毒; 刺突蛋白; 膜蛋白; 昆虫杆状病毒

严重急性呼吸综合征(SARS)是一种新发现的呼吸系统传染病^[1,2]。有研究表明, 导致该病的病原体是一种以前未知的冠状病毒^[3,4], 该病毒被命名为 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)。

对 SARS 冠状病毒的基因组测序以及系统分析显示, 该病毒的基因组中含有一个 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因编码序列和一些病毒结构蛋白, 如刺突蛋白(spike protein, S 蛋白)、膜蛋白(membrane protein, M 蛋白)、核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N 蛋白)和包膜蛋白(envelope protein, E 蛋白)等^[5,6]。这些病毒结构蛋白中的 M 蛋白、N 蛋白^[7]以及 S 蛋白的部分肽段已在真核表达系统中得到了表达^[8-10], 并证实它们均可被用来检测 SARS 病毒的感染^[11-14]。

全长的 S 蛋白包含了更多的病毒抗原信息, 它是冠状病毒的最主要抗原, 含有 1256 个氨基酸。靠近 N 端的部分形成一个球形结构域, C 端形成一个穿膜的棒状结构。它在病毒侵染宿主细胞的过程中介导病毒与细胞膜融合^[15]。部分 S 蛋白前体在宿主细胞内合成后会被切成两部分 S1 和 S2, 其中 S1 为成熟蛋白的球状部分, S2 为成熟蛋白的跨膜部分。

M 蛋白是冠状病毒中含量最多的蛋白质, 在病毒的包装和出芽过程中起到了关键性的作用^[16]。它在病毒侵染宿主的早期抑制宿主基因的转录, 并与病毒引起的宿主细胞凋亡密切相关^[17,18]。M 蛋白由 221 个氨基酸构成, 含 3 个跨膜区。N 端形成较小

的膜外结构域; C 端在病毒颗粒内部, 是一个较大的亲水结构域, 有研究表明该区域能够与病毒核衣壳蛋白相互作用。

这两个蛋白质的全长现已在大肠杆菌中得到了表达^[19,20]。本实验利用昆虫杆状病毒表达系统, 在昆虫细胞内表达全长的 M 蛋白和 S 蛋白, 以获得经过翻译后修饰、具有正确构象、能够在细胞内正确定位的蛋白质。这将是研究 SARS 病毒蛋白结构与功能的基础, 也是预防、诊断并治疗这类疾病的必需环节。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、培养基和细胞株 质粒: pMALMD 含 M 蛋白基因序列^[19], pFS32 含 S 蛋白基因序列^[20], 由本所分子微生物学开放实验室杨晟博士提供; pFastBac-Hta 购自 Invitrogen 公司。菌株: Top 10 本实验室保存; DH 10 购自 Invitrogen 公司。培养基: 细菌培养基 LB 培养基(10 g/L 胰化蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、10 g/L 氯化钠, pH 7.0); 细胞培养基 SFM-900II 购自 Invitrogen 公司; Grace's 培养基, 胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司。细

收稿日期: 2005-10-13 接受日期: 2005-11-21

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.2005CB121000)和中国科学院重要方向性项目(No.KSCX2-SW-318)资助

* 通讯作者。Tel: 021-54924047, E-mail: yongping@sippe.ac.cn

细胞株: SF9 昆虫细胞由本实验室保存; Bm 家蚕细胞由西南大学提供。

1.1.2 试剂 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs(NEB) 公司; Cellfectin 购自 Invitrogen 公司; DAPI 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 供体质粒的构建 构建 pFB-HT SARS-S: 用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 将 SARS 的 S 蛋白基因从质粒 pFS32 中切出, 亚克隆到质粒 pFastBac-HTa 相应酶切位点, 得质粒 pFB-HT SARS-S(图 1)。

构建 pFB-HT M-EGFP: 经 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切重组质粒 pMAL-M 后的 SARS-M 蛋白基因和经 *XhoI* 和 *XbaI* 酶切质粒 pEGFP-N1 的 EGFP 基因一同克隆到质粒 pFastBac-HTa 的 *EcoRI* 和 *XbaI* 位点。从而得到含 SARS-M 蛋白基因的质粒 pFB-HT M-EGFP, 在这个质粒中 M 蛋白的 C 末端融合了绿色荧光蛋白(图 2)。

1.2.2 重组昆虫杆状病毒的构建 构建的供体质粒 pFB-HT SARS-S 和 pFB-HT M-EGFP 经过酶切和测序鉴定出阳性克隆, 分别转化 DH10 细菌。通过蓝白斑筛选发生了重组的 DH10 菌落, 然后从菌中

提取出重组有外源基因的昆虫杆状病毒基因组 DNA Bacmid-SARS-S 和 Bacmid-M-EGFP。

1.2.3 昆虫细胞的培养 SF9 细胞 27 °C 贴壁培养, 培养基为含有 10%FBS 的 SFM-900II 培养基。平均每 2 天更换 1 次培养基, 每隔 3 天传代。Bm 家蚕细胞 27 °C 贴壁培养, 培养基为含有 10%FBS 的 Grace's 培养基。细胞形态呈椭圆形。平均每 3 天更换培养基, 每隔 7 天传代。

1.2.4 重组病毒 DNA 转染昆虫细胞 重组杆状病毒 Bacmid-SARS-S 和 Bacmid-M-EGFP, 通过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 而后以 M13 为引物、重组病毒 DNA 为模板进行 PCR, 来确认外源基因的插入。经过检测挑选出含有外源基因的完整的重组病毒, 再利用脂质体转染昆虫细胞。转染后的昆虫细胞继续培养 5 天后回收培养基上清液, 获得第 1 代有活性的病毒。

1.2.5 重组蛋白质的表达及检测 加入少量第 1 代病毒感染正常 SF9 昆虫细胞, 扩增得到第 2 代、第 3 代高滴度病毒。将第 3 代病毒按照感染复数(multiplicity of infection, MOI) 5~10 感染细胞以表达重组蛋白质, 加毒后第 2 天可见细胞生长受到抑制。

收取染毒后第 3 天和第 4 天的细胞, 加入等体积 2 × 蛋白质上样缓冲液, 沸水浴中裂解细胞。细胞裂解物经 SDS-PAGE 电泳, 然后进行免疫印迹检测。采用的一抗为 Sigma 公司抗 His 标签的单克隆抗体, 二抗为华美生物公司的羊抗鼠 IgG-HRP。

1.2.6 融合蛋白 SARS-M-EGFP 的细胞内定位 将家蚕细胞接种于放置盖玻片的培养皿中, 采用与 SF9 细胞相同条件进行病毒感染。染毒 3 天后, 取出盖玻片。经甲醛固定、Triton-X 100 通透后, 用 DAPI 染色, 封片, 荧光显微镜观察融合蛋白绿色荧光在细胞内的定位^[21]。

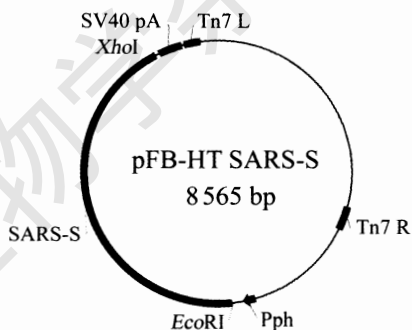


图1 供体质粒 pFB-HT SARS-S

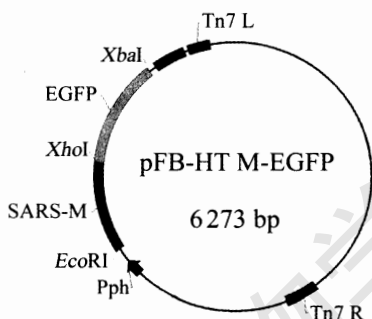


图2 供体质粒 pFB-HT M-EGFP

2 结果

2.1 PCR 鉴定出 SARS-S、M-EGFP 重组杆状病毒

通过蓝白斑筛选挑出的白色 DH10 菌落, 于 37 °C 培养过夜, 而后从过夜培养菌中抽提出杆状病毒基因组 DNA。分别以重组杆状病毒 Bacmid-SARS-S、Bacmid-M-EGFP 和野生型 Bacmid 为模版, 用通用引物 M13 进行 PCR 扩增, 扩增结果见图 3。

同野生型 Bacmid 比较, 另两个重组的杆状病

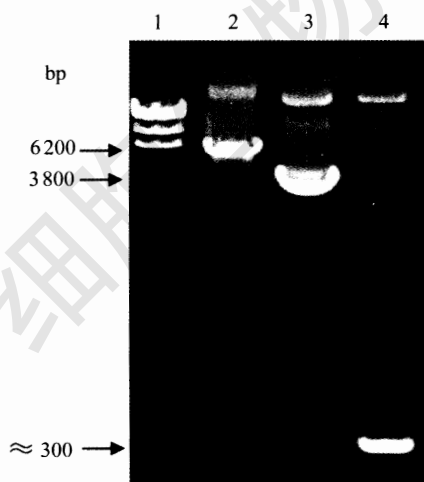


图3 重组杆状病毒PCR鉴定

1: 分子量marker; 2: Bacmid-SARS-S; 3: Bacmid-M-EGFP; 4: 野生型Bacmid(对照)。

毒基因组DNA模版均获得了较大片段的PCR产物。其中Bacmid-SARS-S的PCR产物片段约为6.2 kb, 由于供体质粒pFastBac-Ht系列Tn7转座元件左臂与右臂之间的片段约为2 430 bp, 在多克隆位点中插入的SARS-S蛋白基因全长为3 768 bp, 二者之和为6 198 bp与PCR产物吻合; 同样, Bacmid-M-EGFP的PCR产物片段约为3.8 kb, 其中SARS-M蛋白基因全长为660 bp, EGFP蛋白基因全长为750 bp, 再加上质粒的2 430 bp, 总长度为3 840 bp。从PCR的结果来看, 重组杆状病毒Bacmid-SARS-S和Bacmid-M-EGFP中均有外源基因的插入。

2.2 重组SARS-S蛋白表达以及免疫印迹检测

取较大量的高滴度重组病毒Bacmid-SARS-S感染SF9昆虫细胞, 使得MOI达10。加毒后第2天可见细胞生长被抑制, 部分细胞体积变大, 胞体变空, 表现出明显的病毒感染迹象。收集染毒后第3天的细胞, 加入 $2 \times$ 上样缓冲液, 沸水浴中裂解细胞。细胞裂解物用7%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜后进行免疫印迹检测, 采用的一抗为抗His标签的单克隆抗体, 二抗为羊抗鼠IgG-HRP。结果见图4。

由图可见, 3号泳道与对照组相比, 在130 kDa左右有一明显信号条带, 箭头所指。根据分子量大小以及检测到His标签的存在, 暗示了该蛋白质条带为细胞表达的SARS-S蛋白。在此条带之下还有另外两条信号较强条带, 条带的大小分布与俞浩等在细菌中表达该蛋白质的情况类似^[20]。这两个条带

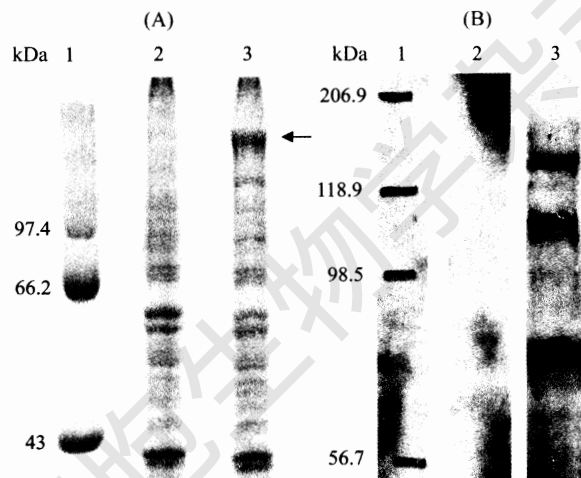


图4 重组SARS-S蛋白免疫印迹检测

A: SDS-PAGE图谱; B: 免疫印迹。1: 分子量marker; 2: 野生型杆状病毒感染SF-9细胞; 3: SARS-S杆状病毒感染SF-9细胞。箭头所指为SARS-S蛋白。

的生成原因将在讨论部分叙述。

2.3 融合蛋白SARS-M-EGFP在家蚕细胞中定位于细胞膜

取感染重组病毒Bacmid-M-EGFP三天后的家蚕细胞, 固定后进行DAPI染色, 荧光显微镜下观察。正常的家蚕细胞呈椭圆形; 受到病毒感染的家蚕细胞体积变大, 感染晚期的细胞开始萎缩, 细胞轮廓变模糊, 细胞膜发生褶皱(图5A-1、图5B-1、图5C-1)。在紫外光激发下, 经DAPI染色的细胞核呈蓝色荧光(图5A-2、图5B-2、图5C-2); 融合蛋白C端的绿色荧光蛋白发出绿色荧光(图5A-3、图5B-3)。从两种荧光融合的图中(图5A-4、图5B-4、图5C-4)可以看到, 绿色荧光与蓝色荧光不能共定位; 对照自然光, 绿色荧光多出现在家蚕细胞的细胞膜部分。这暗示了, SARS-M蛋白在家蚕细胞内表达后不存在于细胞核内, 而定位在细胞膜上。

3 讨论

SARS-S蛋白在SF9昆虫细胞中能够获得全长表达, 但表达量较低。细胞裂解物总蛋白经7% SDS-PAGE电泳后银染, 仅能看到微弱条带。蛋白质免疫印迹能够特异性地识别纳克级的重组蛋白质, 因而能够清晰的显示出重组蛋白质的表达条带(图4)。S蛋白在家蚕细胞株中的表达量更低, 其原因可能在于我们所用的昆虫杆状病毒是AcMNPV, 它的天然宿主是斜纹夜蛾, 从而重组病毒感染家蚕细胞效

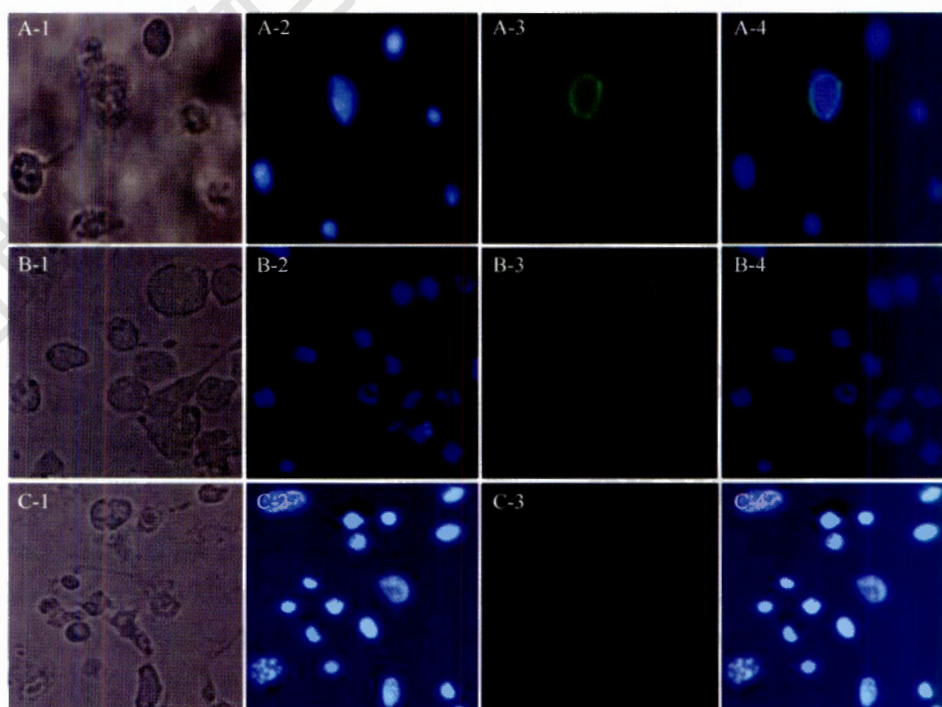


图5 SARS-M-EGFP 蛋白在细胞内的定位

A、B：M-EGFP 重组杆状病毒感染细胞；C：非重组病毒感染细胞。A-1、B-1、C-1：自然光线下的家蚕细胞；A-2、B-2、C-2：DAPI 染色；A-3、B-3、C-3：绿色荧光检测；A-4、B-4、C-4：蓝色与绿色荧光融合。

率较低，导致表达量不高。

S 蛋白全长 1 256 个氨基酸，其中 729~770、879~1 016、1 164~1 185 这 3 段氨基酸序列可形成 3 个螺旋区域，1 197~1 218 氨基酸序列为一段穿膜序列，这些区域构成了 S 蛋白的棒状跨膜结构 S₂，在第一个螺旋结构之前的氨基酸序列可形成一个球状的结构域 S₁^[6]。据推测 S₁ 部分分子量约 70 kDa，S₂ 部分分子量约为 60 kDa。免疫印迹检测中所得到的两个分子量较小的信号条带，其中一条可能是 S 蛋白被剪切后生成的 S₁ 部分，另外一条可能是 S 蛋白被部分降解的产物。

SARS-M 蛋白序列中含有 3 段跨膜序列，因而成熟蛋白应当定位在细胞的膜结构上。我们在 M 蛋白的 C 末端融合了 EGFP，利用带有融合蛋白的重组杆状病毒感染家蚕细胞，通过荧光显微镜来观察带有绿色荧光的 M 蛋白在家蚕细胞内的定位。荧光显微镜照片显示出，AcMNPV 对家蚕细胞的感染效率很低，在 MOI 近似等于 10 的病毒量下，仅能达到 2%~3% 的感染效率。根据蓝、绿荧光共定位照片(图 5A-4、图 5B-4、图 5C-4)可以看出，融合蛋白不存在于细胞核内。对照绿色荧光照片和自然光下细胞的形态，提示了融合蛋白多出现在细胞的边

缘，即细胞膜上。

综上所述，我们利用昆虫表达系统成功地表达了 SARS 病毒的结构蛋白中全长的 S 蛋白和 M 蛋白，并且 M 蛋白在细胞内能够正确定位。

感谢中科院生化细胞所吴祥甫研究员对本文初稿的审阅和修改；感谢本所郑慧琼老师提供的帮助；感谢本实验室张勇、郭秋红、王四宝和刘文斌的协助。

参考文献 (References)

- [1] Lee N *et al.* *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1986
- [2] Poutanen SM *et al.* *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1995
- [3] Peiris JS *et al.* *Lancet*, 2003, **361**: 1319
- [4] Ksiazek TG *et al.* *N Engl J Med*, 2003, **348**: 1953
- [5] Marra MA *et al.* *Science*, 2003, **300**: 1399
- [6] Rota PA *et al.* *Science*, 2003, **300**: 1394
- [7] Mortola E *et al.* *FEBS Lett*, 2004, **576**: 174
- [8] Hua RH *et al.* *DNA Cell Biol*, 2005, **24**: 503
- [9] Lai CW *et al.* *Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 883
- [10] Ren AX *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, **36**: 754
- [11] He Q *et al.* *J Virol Methods*, 2005, **127**: 46
- [12] He Q *et al.* *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, **12**: 321
- [13] Manopo I *et al.* *J Immunol Methods*, 2005, **296**: 37

- [14] Saijo M *et al. J Virol Methods*, 2005, **125**: 181
[15] Hofmann H *et al. J Virol*, 2004, **78**: 6134
[16] de Haan CA *et al. J Virol*, 1999, **73**: 7441
[17] Kopecky SA *et al. J Virol*, 2001, **75**: 12169
[18] Kopecky SA *et al. J Virol*, 2003, **77**: 4658
[19] Zhang XL *et al. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 2003, **35**: 1140
[20] Yu H *et al. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 2003, **35**: 774
[21] Ge YZ *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 25447

Expression Spike Protein and Membrane Protein of SARS-coronavirus in the Insect Baculovirus

Shi-Hai Jia, Bo Zhou, Jun Wu, Mu-Wang Li, Min-Hui Pan¹, Cheng Lu¹, Xue-Xia Miao, Yong-Ping Huang*
(*Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ¹Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China*)

Abstract SARS-Coronavirus is the pathogen of human severe acute respiratory syndrome. Studies on other species of coronaviruses indicated that the spike protein (S protein) and membrane protein (M protein) are the main structural proteins of the virus. As recombinant M protein and S protein can be used as antigens to detect coronavirus infection and to generate vaccines, the expression of these two genes is definitely necessary. In the current study, the genes of the two proteins were cloned and recombined into the genome of insect baculovirus. Then, the S protein and M protein were expressed in the insect cell lines by using the recombinant baculovirus, and the GFP fusion protein hints that M protein locates on the membrane of cells.

Key words SARS; coronavirus; spike protein; membrane protein; insect baculovirus

Received: October 13, 2005 Accepted: November 21, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2005CB121000) and the Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-SW-318)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54924047, E-mail: yongping@sippe.ac.cn