

• 基础实验研究论著 •

# SARS 病毒 M 蛋白真核表达载体的构建与表达

钱 超,余建华,吴文静

(中国人民解放军第 454 医院检验科,江苏南京 210002)

**摘 要:****目的** 构建 SARS 病毒 M 蛋白片段真核表达载体,并检测其在 Vero 细胞中的表达。**方法** 在 PCR 引物下游引入 Flag 序列,以 PCR 从质粒 pGEX-6P-1-SARS-M 中扩增 M 蛋白编码基因片段,将酶切后的 PCR 产物克隆至 pcDNA3.1(+)中,构建并鉴定重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M。重组质粒经 Superfect 转染 Vero 细胞,Western blot 检测基因表达情况。**结果** 重组质粒经酶切鉴定和基因测序显示构建正确;Western blot 检测表明重组 M 蛋白片段在 Vero 细胞中获得正确表达。**结论** 成功构建 SARS 病毒 M 蛋白片段真核表达载体,并在 Vero 细胞中获得正确表达,为进一步研究 M 蛋白的功能奠定了基础。

**关键词:**SARS 病毒; M 蛋白; 真核表达

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)06-0650-02

## Construction and expression of eukaryotic expression vector of SARS-CoV M protein

Qian Chao, Yu Jianhua, Wu Wenjing

(Department of Clinical Lab, 454 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

**Abstract:****Objective** To construct eukaryotic expression vector of SARS-CoV M protein, and detect its expression in Vero cell.  
**Methods** A pair of PCR primers with a Flag sequence, ligated downstream, were designed to amplify gene fragments, encoding M protein, from plasmid pGEX-6P-1 + SARS-M. PCR products, digested by enzymes, were cloned into expression vector pcDNA3.1(+) to construct recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-SARS-M. Recombinant plasmid was transfected into Vero cell with Superfect. The expression of recombinant M protein in Vero cell was detected by Western blot.  
**Results** Recombinant plasmid was confirmed correct with enzymes digestion and gene sequence analysis. Western blot demonstrated that M protein fragments could be correctly expressed in Vero cell.  
**Conclusion** Eukaryotic expression vector of SARS-CoV M protein was construct successfully, and recombinant M protein could be expressed correctly in Vero cell, which laid a foundation for investigating the function of M protein.

**Key words:**SARS-virus; M protein; eukaryotic expression

严重急性呼吸综合征(SARS)是由 SARS 相关冠状病毒(SARS-CoV)引起的严重急性呼吸系统传染病,该病潜伏期短,传染性强,死亡率高。尽管 SARS 疫情已得到控制,但仍然存在复发可能。因此,研制预防、诊断和治疗的方法具有重要意义。基因测序分析表明,SARS-CoV 为新型冠状病毒,属于套病毒目、冠状病毒科,为单股、正链 RNA 病毒。其主要结构蛋白有纤突蛋白(S)、包膜蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)<sup>[1-4]</sup>。M 蛋白作为冠状病毒的重要抗原之一,在冠状病毒成熟过程和诱导宿主中和反应方面起着重要作用。已有研究证实 M 蛋白 N 端含有由 1~43 个氨基酸构成的 B 细胞抗原表位<sup>[2-3]</sup>。本研究构建了含 M 蛋白 N 段 43 个氨基酸编码基因真核表达载体 pcDNA3.1(+)-SARS-M,并转染 Vero 细胞,并检测了其表达情况,以期为进一步研究 M 蛋白功能提供帮助。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 重组质粒 pGEX-6P-1-SARS-M 由笔者前期构建<sup>[3]</sup>,大肠埃希菌 DH5a 和 Vero 细胞由南京医科大学卢春教授馈赠。限制性内切酶 HindⅢ、BamHⅠ, T<sub>4</sub> DNA 连接酶及质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司;质粒转染试剂盒(Superfect Transfection Reagent)购自美国 Qiagen 公司;抗 Flag 单抗购自 Sigma 公司;羊抗鼠 HRP-IgG 购自武汉博士德公司;ECL 试剂盒购自 Amersham 公司;预染蛋白分子标记物购自 MBI 公司;PCR 引物由申能博采公司合成。其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

#### 1.2 方法

**1.2.1 目的基因的扩增** 以重组质粒 pGEX-6P-1-SARS-M 中长度为 129 bp 的 M 蛋白编码基因为模板,设计引物(P1:5'-TG CGT AAG CTT GCC ACC ATG GCA GAC AAC GGT

AC-3'; P2:5'-G CGT GGA TCC CTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GCC TCC CCT GTT CCG ATT AGA ATA G-3';斜体部分分别为 HindⅢ 和 BamHⅠ 限制性酶切位点,划线部分为 Flag 序列 8 肽,方框部分为连接子)。PCR 反应体系:10×缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)0.5 μL, P1 1 μL, P2 1 μL, pGEX-6P-1-SARS-M 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL, 补去离子水至 25 μL。在 PE480 型 PCR 仪上进行基因扩增,反应条件:94 ℃ 8 min, 94 ℃ 1 min, 63 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 循环 30 次, 72 ℃ 8 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.2 重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 的构建** PCR 产物胶回收片段与 pcDNA3.1(+)空载体分别经 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切,酶切产物经胶回收后用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接。反应体系:酶切后的 M 基因 5 μL,酶切后的线性载体 pcDNA3.1(+)2 μL, 10×连接缓冲液 1 μL, T4DNA 连接酶 1 μL, 补去离子水至 10 μL。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a,使用含氨苄西林(终浓度 50 μg/mL)LB 平板进行筛选。  
**1.2.3 重组质粒的酶切鉴定及基因测序** 挑取氨苄抗性克隆,增菌后提取重组质粒,经 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切后行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。酶切鉴定正确的重组质粒由申能博采公司完成测序。

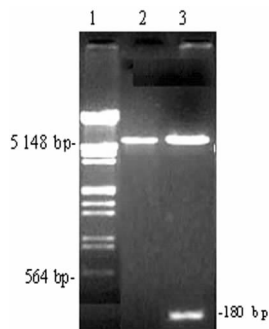
**1.2.4 重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 转染 Vero 细胞** 将提取的重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 用 Superfect 行质粒转染试验。Vero 细胞培养液为 DMEM,内含 10% 灭活胎牛血清,2 mmol/L L-谷氨酰胺以及青-链霉素双抗。转染前一天接种 1×10<sup>5</sup> 个细胞于 6 孔板中,次日待细胞长至 60%~80% 时,行重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 转染试验。同时用

pcDNA3.1(+)-空质粒转染 Vero 细胞作对照。

**1.2.5 重组 M 蛋白在 Vero 细胞中表达的检测** Vero 细胞培养 48 h, 经 PBS 洗涤后加入适量 SDS 上样缓冲液制成细胞混悬液, -70 °C 冻存备用。取未处理、空质粒转染及重组质粒转染 Vero 细胞, 100 °C 煮沸 5 min, 冰水浴 2 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入点样孔, 每孔 12  $\mu$ L, 同时加预染中分子量标准蛋白质分子标志物, 电压 60 V 条件下电泳至样品全部离开点样孔, 电压 100 V 电泳 1.5 h; 电泳完毕后剥胶, 用 Bio-RAD 电转移仪将聚丙烯酰胺凝胶上蛋白条带转印至 PVDF 膜; 将 PVDF 膜置于杂交袋中, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 弃封闭液, 加入经 1:3 000 稀释的抗 Flag 单抗, 4 °C 过夜, 次日 PBS 洗涤后加入 HRP 标记羊抗鼠二抗, 37 °C 孵育 2 h, PBS 洗涤后, 行 ECL 检测。以  $\beta$ -Actin 作为对照。

## 2 结果

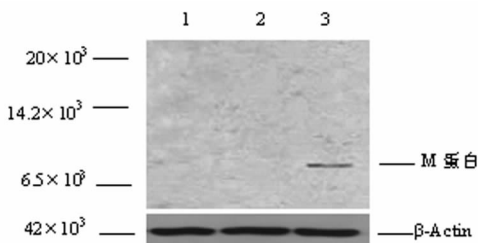
**2.1 重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 的酶切鉴定及核苷酸序列测定** 重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 经 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切后, 酶切产物电泳结果显示载体片段约为 5 400 bp, 插入片段约为 180 bp, 与预期大小相一致(见图 1)。基因测序结果显示插入基因全长为 159 bp; Blast 结果显示, 插入基因与 GeneBank 中 BJ01 株序列完全相同, 目的基因下游通过连接子 GGAGGC 连接编码 Flag 的基因。



1: DNA 分子标记物( $\lambda$ DNA/HindⅢ + EcoRⅠ); 2: 空质粒酶切; 3: 重组质粒酶切。

图 1 重组质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M 的酶切鉴定

**2.2 Western blot 检测 M 蛋白在 Vero 细胞中的表达** 结果显示 Vero 细胞及转染了空质粒的 Vero 细胞经 ECL 检测未见条带, 经重组质粒转染的 Vero 细胞在预期位置(相对分子质量  $9.2 \times 10^3$ )可见明显条带, 表明重组 M 蛋白片段在 Vero 细胞中获得正确表达(见图 2)。



1: 未处理 Vero 细胞; 2: 空质粒转染 Vero 细胞; 3: 重组质粒转染 Vero 细胞。

图 2 重组 M 蛋白片段在 Vero 细胞中的表达

## 3 讨论

冠状病毒为有包膜的单股、正链 RNA 病毒, 可感染哺乳动物和鸟类, 分为 3 种血清组。SARS-CoV 是一种新型冠状病毒, 曾引起 SRAS 全球暴发流行, 其致死率(10%)超过目前已

知的任何一种冠状病毒。2004、2005 年先后确定了两种新型人冠状病毒 HCoV-NL63、HCoV-HKU1<sup>[5]</sup>。SARS-CoV 基因组结构、编码蛋白和已知 3 组冠状病毒并不完全相同, 其种系发生和分组仍有争议<sup>[4,6]</sup>。冠状病毒基因组长度约 27~32 kb, 是已知 RNA 病毒中最大的基因组<sup>[7]</sup>。基因组从 5'至 3'依次编码 RNA 聚合酶及 S、E、M、N 蛋白。其中 S 蛋白、M 蛋白、E 蛋白为包膜糖蛋白。和其他冠状病毒类似, SARS-CoV 的 M 蛋白亲水 N 端位于包膜外, 紧邻 3 个疏水性跨膜区, 3 次穿越脂质双分子层, 最后为较长的包膜内区<sup>[4]</sup>。M 蛋白是病毒包膜上含量最大的结构蛋白, 在宿主细胞内表达是 E 蛋白的一百倍以上。研究显示敲除 M 蛋白跨膜区基因将影响其亚细胞定位及病毒颗粒装配<sup>[8-10]</sup>。M 蛋白不仅含有保护性抗原, 还含有可诱导细胞免疫的 T 细胞表位<sup>[11]</sup>。甘燕等<sup>[12]</sup>的研究也证实, 重组 SARS-CoV M 蛋白具有很好的免疫原性和抗原性, 重组 M 蛋白可诱导小鼠产生较强的体液及细胞免疫应答。

笔者曾构建了 M 蛋白片段编码基因的重组原核表达质粒, 在大肠埃希菌中成功表达 GST 融合蛋白, 并通过截短基因表达筛选证实其 N 段 1~15 个氨基酸中含有 B 细胞表位<sup>[3]</sup>。与原核表达的重组蛋白不同, 真核表达的重组蛋白可完成糖基化。M 蛋白是糖基化蛋白, 在其 N 端有 1 个潜在 N-连接糖基化位点和 4 个 O-连接糖基化位点。糖基化对重组蛋白的溶解度、稳定性及活性有重要影响。M 蛋白的糖基化对病毒毒力影响不大, 但与病毒和宿主间的相互作用密切相关<sup>[13]</sup>。Flag 亲和和标签序列是由 8 个氨基酸残基(DYKDDDDK)组成的表位标记物, 融合表达后对目标蛋白的结构和功能影响小。本试验构建了重组真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-SARS-M, 经双酶切电泳鉴定, 获得大小约 180 bp、与 Flag 序列相融合的 M 蛋白编码基因片段。经测序后证实与 GeneBank 中 SARS-CoV BJ01 株序列完全一致。采用 Superfect 将重组质粒转染至 Vero 细胞, 经 Western blot 证实重组 M 蛋白获得正确表达, 说明重组质粒转染 Vero 细胞获得成功。由于 M 蛋白在冠状病毒成熟、诱导体液及细胞免疫等方面具有重要作用, 成功获得真核表达的重组 M 蛋白片段有助于进一步研究其功能。

## 参考文献

- [1] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as possible cause of severe acute respiratory syndrome[J]. Lancet, 2003, 361(9366): 1319-1325.
- [2] He Y, Zhou Y, Siddiqui P, et al. Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3718-3726.
- [3] Qian C, Qin D, Tang Q, et al. Identification of a B-cell antigenic epitope at N-terminus of SARS-CoV M protein and characterization of monoclonal antibody against the protein[J]. Virus Genes, 2006, 33(2): 147-156.
- [4] Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. Science, 2003, 300(5624): 1399-1404.
- [5] 刘玢, 王琼, 林广裕, 等. 新型冠状病毒 NL63 在急性呼吸道感染婴幼儿中的检出及鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 824-826.
- [6] Gorbalenya AE, Snijder EJ, Spaan WJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus[J]. J Virol, 2004, 78(15): 7863-7866.
- [7] 侯庆华, 侯英奇, 梁念慈. SARS 冠状病毒主蛋白酶结构的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(10): 911-915. (下转第 653 页)

本组患者 HBsAg 阳性率为 6.88%，与任丽民等<sup>[3]</sup>的报道基本一致。4 项血液传染性指标中，HBsAg 阳性率最高，说明不可轻视乙型肝炎病毒 (HBV) 在中国的流行趋势。在部分 HBV 感染人群中，血清 HBsAg 水平较低，而目前普遍采用的 ELISA 技术灵敏度、特异度均不理想，易造成假阴性或假阳性结果。因此，单纯 HBsAg 阴性不能完全排除 HBsAg 的存在。多数情况下，HBsAg 和乙型肝炎病毒核心抗体 (HBcAb) 同时阳性者占 HBV 感染者的 94.17%。输血前同时检测 HBsAg 和 HBcAb 有助于避免漏检血清 HBsAg 水平较低的 HBV 感染者。结果表 1 显示，2008~2010 年患者 HBsAg 阳性率虽呈逐年下降趋势，但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，说明国内 HBV 疫苗接种工作任重而道远，还需加强对易感人群的保护，提高易感人群的抵抗力。

丙型肝炎病毒 (HCV) 主要由血液或血制品传染，多数 HCV 感染将发展为慢性 HCV 携带状态或慢性肝炎，部分可进展为肝硬化或肝细胞癌<sup>[4]</sup>。笔者分析了 78 例抗-HCV 阳性患者的感染途径，发现有输血史者仅占 25.6% (20/78) (结果未显示)，说明输血不是 HCV 感染的惟一途径。除了血液外，唾液、尿液、汗液和精液亦可导致 HCV 传播。HCV 传播途径多于甲型肝炎病毒 (HAV) 及 HBV，危害也更为严重。有研究表明，HCV 的主要传播途径是输血、器官 (骨髓) 移植和被含有 HCV 的血液污染损伤的皮肤或黏膜，其次是母婴传播，再次是性行为 and 密切接触传播<sup>[5]</sup>。多数与输血有关的医疗纠纷由 HCV 感染所致，因此，不仅应在输血前对患者进行抗-HCV 检测，还应采用灵敏度较高的检测技术，如 PCR、微流芯片法、HCV 核心抗原检测法和化学发光法等<sup>[6-8]</sup>，从而提高 HCV 检出率、缩短检测“窗口期”，以保证结果的准确性。

本研究中，抗-TP 阳性率为 1.04%，仅次于 HBsAg。近年来梅毒发病率升高很快，先天性梅毒发病率也有所升高，已成为较为严重的公共卫生问题。与此同时，梅毒与艾滋病密切相关，梅毒发病率高，意味着性乱现象严重，为艾滋病的流行提供了条件。除人为因素可引起梅毒检测假阳性外，非密螺旋体疾病的病原体 and 某些疾病 (如系统性红斑狼疮、疟疾、斑疹伤寒及乙型病毒性肝炎等) 所致的反应素反应等均可导致假阳性结果。因此，对抗-TP 阳性标本应采用 TPPA 进行确证检测，并结合患者临床资料对检测结果进行合理分析。

本研究中，抗-HIV 阳性率为 0.03%，与黄聪等<sup>[9]</sup>的报道相近，但高于任红霞<sup>[10]</sup>的报道。艾滋病是全球性问题，由于不同国家经济条件、医疗水平、检测能力等存在差异，艾滋病患者实际例数与统计资料可能存在较大误差。目前在发展中国家发现的艾滋病患者可能仅仅是实际患者的很少一部分，尚有大量患者未被发现。国内 HIV 感染目前仍局限于特殊人群，如

静脉吸毒者、性滥者等。在《献血法》实施前，部分地区的采供血机构管理混乱，导致 HIV 在少数地区流行。HIV 感染早期症状不典型，患者常因消化道、肺部真菌，假单胞菌感染，巨细胞病毒感染，病毒性肝炎或皮损等于不同临床科室就诊，多重或多部位机会性感染则常见于已发病的 HIV 感染患者。若患者在输血后才发现 HIV 感染，极易导致医疗纠纷。因此，临床应提高对 HIV 感染的警惕性，避免出现误诊或漏检现象。输血治疗是重要的临床治疗措施之一，是临床抢救危重患者的有效手段，但输血存在一定风险，有可能导致血液传染性疾病。虽然卫生部对血液制品检测进行了严格规定，但是输血的风险性仍不可低估。因此，在输血治疗前对患者进行血液传染性指标检测意义重大，既有利于明确医患责任，避免医疗纠纷，也有利于及时发现已感染的患者，便于医护人员在诊治过程中对患者采取针对性的消毒、隔离措施，加强自我防护和合理处置医疗器械与污染物，避免医源性污染<sup>[11-12]</sup>。

## 参考文献

- [1] 付千钧, 李军, 彭长华. 50 473 例输血前传染性指标检测结果分析及其分布[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 650-652.
- [2] 杜军, 龚燕, 张连刚. 1 256 例患者受血前传染病指标检测结果的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 655-657.
- [3] 任丽民, 余明杰, 王萍, 等. 四种血液传播疾病的检测和结果分析[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(2): 172-173.
- [4] Brecher ME. AABB Technical Manual[M]. 15th edition. Bethesda MD: American Association of Blood Banks, 2005: 667-675.
- [5] 田兆嵩. 临床输血学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 260-261.
- [6] 姚仁南, 姚根宏, 栾建凤, 等. 核酸扩增及微流芯片技术在献血者血液 HCV 筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1540-1542.
- [7] 姚仁南, 张建辉, 黄晓静, 等. 在安全输血中应用丙型肝炎病毒核心抗原检测技术的初步探索[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(3): 617-618.
- [8] 姚仁南, 陈复兴, 陈玲, 等. 化学发光免疫分析法检测献血者 HCV 抗体的应用评价[J]. 中华全科医学, 2011, 9(3): 450-453.
- [9] 黄聪, 孙家志, 谭瑞琼. 广西沿海地区无偿献血者抗-HIV 检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(4): 351-353.
- [10] 任红霞. 新乡地区无偿献血者 HIV 感染情况的调查分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(4): 345-353.
- [11] 万柏珍, 徐雅平, 王石云, 等. 输血前患者检测传染性指标的重要意义[J]. 中国误诊杂志, 2005, 5(15): 2913.
- [12] 姚仁南, 陈复兴, 李玺, 等. HCV 胶体金试剂在急诊患者手术输血前的快速检测[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(4): 289-291.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 651 页)

- [8] Ma HC, Fang CP, Hsieh YC, et al. Expression and membrane integration of SARS-CoV M protein[J]. J Biomed Sci, 2008, 15(3): 301-310.
- [9] Huang Y, Yang ZY, Kong WP, et al. Generation of synthetic severe acute respiratory syndrome coronavirus pseudoparticles: implications for assembly and vaccine production[J]. J Virol, 2004, 78(22): 12557-12565.
- [10] McBride CE, Machamer CE. A single tyrosine in the severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein cytoplasmic tail is important for efficient interaction with spike protein[J]. J Virol, 2010, 84(4): 1891-1901.

- [11] Liu J, Sun Y, Qi J, et al. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes[J]. J Infect Dis, 2010, 202(8): 1171-1180.
- [12] 甘燕, 吴少庭, 秦莉, 等. 重组 SARS 病毒 M 蛋白的免疫效应研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(5): 331-334.
- [13] de Haan CA, Rottier PJ. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses[J]. Adv Virus Res, 2005, 64(1): 165-230.

(收稿日期: 2011-10-09)