

SARS冠状病毒复制酶蛋白 nsp8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 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 哈尔滨 150030)

摘要 以 SARS 冠状病毒 (BJ01 株) 基因组 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到 SARS-CoV nsp8 基因, 并克隆到原核表达载体 pGEX-6p-1 中, 构建重组质粒 pNSP8E。pNSP8E 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达出可溶性的 GST-nsp8 融合蛋白, 经亲和层析和自剪切获得了高纯度 nsp8 蛋白。以 nsp8 为抗原免疫家兔, 制备了 nsp8 的多克隆抗体, 为下一步研究其在病毒感染的细胞中的功能奠定了基础。

关键词 SARS 冠状病毒 复制酶 表达

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome) 以急性呼吸系统衰竭为特征, 在发病早期即出现肺实变体征, 伴有高热、乏力、腹泻、头痛、肌肉疼痛等症状, SARS 冠状病毒 (SARS coronavirus SARS-CoV) 是引起该病的元凶^[1,2]。SARS-CoV 为具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组约长 29~31 kb, 是目前已知的 RNA 病毒中最大的。SARS-CoV 基因组具有和其他冠状病毒一样的特征性构成, 以一种不连续转录方式从负链 RNA 上转录得到所有的亚基因组 mRNA (subgenomic mRNAs sg mRNAs) 以及各种结构蛋白的 mRNA; 基因组从 5' 到 3' 端依次编码复制酶蛋白 (replicase, rep)、刺突蛋白 (spike protein S)、囊膜蛋白 (envelope protein E)、膜蛋白 (membrane protein M) 和核蛋白 (nucleocapsid protein N) 以及其他一些辅助性蛋白^[3]。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 (≈ 21.2 kb), 在该区域的 nt13 392-13 398 存在保守的 UUUAAAC 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 486 kDa) 扩展为由 ORF1b 编码的 pp1ab (约 790 kDa), pp1a 和 pp1ab 共同组成 SARS-CoV 的复制酶蛋白复合

体^[3,4]。进一步的分析表明, 该复合体可由其自身编码的两个蛋白酶: 木瓜水解蛋白酶 (papain-like proteinase PLPpro) 和 3C 样胰凝乳蛋白酶 (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)^[5]。根据推测, 这些复制酶蛋白所具有的酶活性依次为: 木瓜水解蛋白酶 (PLPpro, nsp3)、3C 样胰凝乳蛋白酶 (3CLpro, nsp5)、RNA 依赖性聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase RdRp, nsp12)、解旋酶 (superfamily 1-like helicase Hel, nsp13)、3'-5' 外切核酸酶 (exonuclease ExoN, nsp14)、内切核酸酶 (endonuclease XendoU, nsp15)、2 核糖甲基转移酶 (2'-O-methyl transferase 2'-O-MT, nsp16)^[6]。冠状病毒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, 而目前这种分子机制仍不清晰。本研究针对功能未知的复制酶蛋白 nsp8 从 SARS-CoV (BJ01 株) 中扩增出该蛋白基因全长片段, 并在大肠杆菌中获得了可溶性表达, 为探讨其在病毒复制、转录调控以及细胞内蛋白质之间的相互作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、毒株和材料

大肠杆菌工程菌株 DH5 α 、BL21(DE3), 表达载体

收稿日期: 2005-04-01 修回日期: 2005-07-13

* 黑龙江省科技攻关项目

** 通讯作者, 电子信箱: xgkong@hvri.ac.cn & pangh@xtal.tsinghua

edu.cn

pGEX 6p-1由本实验室保存, SARS-CoV 为 BJ01株。引物合成、DNA 测序由上海生工生物工程公司完成, AMV Reverse Transcriptase, Rnase Inhibitor为 Invitrogen 公司产品, 所用限制性内切酶 *Bam*H I和 *Eco*R I、*Taq* 酶、IPTG 为 TaKaRa公司产品, Glutathione sepharose 4B, preScission protease为 Amersham Biosciences产品, 弗氏完全、不完全佐剂为 Sigma公司产品, 其它试剂均为国产分析纯产品。实验动物为哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供的普通级哈白兔。

1.2 SARS-CoV *nsp8* 基因的克隆和表达载体构建

SARS-CoV (BJ01株)非结构蛋白 *nsp8*的 cDNA 模板板常规方法在哈尔滨兽医研究所生物安全三级实验室制备, 根据 BJ01株基因组 (Genbank 登录号: AY278488)中 *nsp8*序列设计引物, 上游引物加入 *Bam*H I 酶切位点 5'-GCC GGA TCC GCT ATT GCT TCA GAA TTT - 3', 下游引物加入 *Eco*R I酶切位点: 5'-CCG GAA TTC TTA CTG TAG TTT AAC AGC TGA -3', 阴影部分表示引入的酶切序列。PCR 扩增 (95℃ 5min; 94℃ 30 s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 30 循环; 72℃ 10min) 产物, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 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 *nsp8*表达和纯化

鉴定为阳性的质粒 pNSP8E 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)中, 挑取单一菌落, 接种 LB培养基过夜培养, 次日将过夜培养的菌液以 1: 100的比例接种到新鲜的 LB培养基中, 37℃培养至 A₆₀₀ ≈ 0.9时 加入 IPTG 至终浓度为 0.05mmol/L, 16℃继续培养 20h, 5 000 r/min 离心 30min 收集菌体。将收集的菌体重悬于冰冷的 PBS 中, 加入溶菌酶至终浓度 100μg/ml, 30℃水浴 15min 以超声波裂解菌体 (冰浴)至透明, 15 000r/min 离心 30min 收集上清液, 并以一次性滤器过滤除菌除杂。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左右普通级哈白兔, 用纯化 *nsp8*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 分析鉴定血清的效价。

2 结 果

2.1 *nsp8* 基因的 PCR 扩增结果

PCR 扩增得到一条在 500~ 750bp 之间的特异片段, 与预计结果 615bp 相一致 (图 1)。

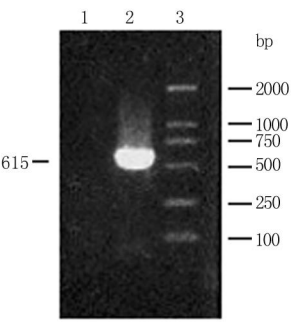


图 1 *nsp8* 基因的 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR product of *nsp8* gene

1: PCR negative control; 2: PCR product; 3: DNA Marker DL2 000

2.2 *nsp8* 基因的克隆与鉴定

将扩增得到的 DNA 片段连接到表达载体 pGEX6p-1上, 以 PCR 对重组质粒进行鉴定获得一条 615bp 的条带, *Bam*H I /*Eco*R I 双酶切对重组质粒进行鉴定得到约 4 900bp (载体) 和 615bp (目的片段) 两条带, 阳性质粒命名为 pNSP8E (图 2), 阳性质粒的测序结果表明获得的 *nsp8* 重组表达载体序列正确无误。

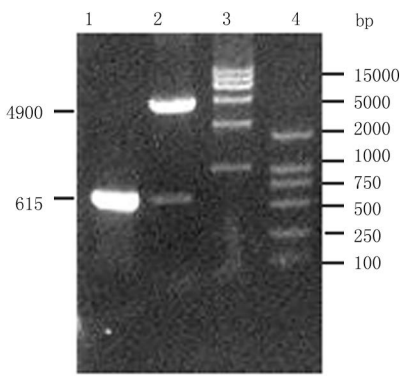


图 2 阳性克隆的鉴定

Fig 2 Identification of recombinant plasmid

1: Amplified product by PCR; 2: Digested product by *Bam*H I and *Eco*R I; 3: DNA Marker DL 15 000; 4: DNA Marker DL2 000

2.3 *nsp8* 蛋白的表达

12% SDS-PAGE 分析表明, 经 IPTG 诱导后的重组菌 BL21 (DE3) pNSP8E, 表达出一条大小为 48kDa 的特异蛋白带, 经破菌后证明其以可溶性存在于上清液

中,进一步地纯化和酶切后,分别获得了大小为 48kDa 的融合蛋白和 22kDa 的 nsp8 蛋白(图 3)。

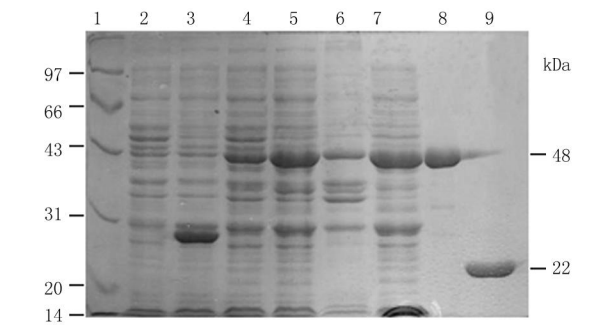


图 3 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig 3 Analysis of the expression product by SDS-PAGE
1: MiddleMW protein marker; 2: BL21 (DE3) induced with IPTG; 3: BL21 (DE3) pGEX-6p1 induced with IPTG; 4: BL21 (DE3) pNSP8E uninduced with IPTG; 5: BL21 (DE3) pNSP8E induced with IPTG; 6: Pellet of BL21 (DE3) pNSP8E induced with IPTG; 7: Supernatant of BL21 (DE3) pNSP8E induced with IPTG; 8: Product purified by Glutathione sepharose 4B; 9: nsp8 protein

2.4 Western blotting检测免疫后血清

将实验兔免疫前血清作 1:100 稀释、免疫后血清作 1:1000 稀释,同时进行 Western blotting 分析,表明免疫前血清不与免疫原 nsp8 蛋白发生反应,免疫后血清与免疫原 nsp8 蛋白产生良好的免疫反应,免疫结果良好(图 4)。

3 讨论

实验中我们克隆了全长 594bp 的 nsp8 基因,并在大肠杆菌中表达出可溶性的 22kDa 大小的蛋白,这与 Prentice 等^[7]通过 Western blotting 分析证明 nsp8 蛋白大小在 22kDa 的报道相一致。目前,在 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞中,已经鉴定出 16 个复制酶蛋白中的 12 个 (nsp1-5, 8-9, 12-16),并在感染后 6h 内就可以用抗体检测到复制酶蛋白的表达。免疫荧光显示在感染的细胞内,nsp8 分布在细胞核周围以及细胞浆中的内质网和小泡中;激光扫描共聚焦显微镜共定位分析表明 nsp8 和 nsp2、nsp3 共同存在于细胞浆中,且和自吞噬小体的标志蛋白 (LC3) 共同存在,进一步说明病毒基因组 RNA 的转录、复制是在胞浆中进行^[7]。Sutton 等^[8]获得的 nsp8 是以二聚体(分子量约为 50kDa)的无功能形态存在,进一步实验表明 nsp8 天然蛋白中的 C 末端区域可能存在 43~84 位氨基酸残基的线性结构的调整,这种调整是由于 nsp9 和 nsp8 相互作用的结

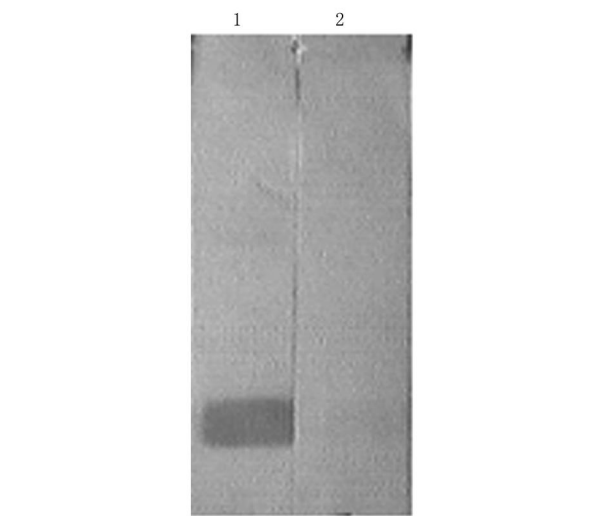


图 4 Western blotting 检测抗 nsp8 血清

Fig 4 Analysis of the serum anti-nsp8 by Western blotting
1: Anti-nsp8 serum (1:1000 dilution); 2: Pre-immune serum (1:100 dilution)

果,进而展现出 nsp8 的功能形态;Geoff 等的浮选分布实验表明 nsp8 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 Brockway 等^[9]一般认为病毒复制的复合体都具有膜相关性的结论相反。鼠肝炎病毒 (mouse hepatitis virus, MHV) 与 SARS-CoV 的复制酶蛋白有高度的同源性,在 MHV-A59 感染的细胞内,与 nsp8 相对应的 MHV 的 p1a-22 蛋白和病毒的解旋酶 (Hel)、3C 样胰凝乳酶 (3CLpro) 以及 p1a-10、p1a-12、p1a-15 等形成复合体,但 p1a-22 蛋白更广泛的分布于细胞浆中表明其具有独立于该复合体之外的单独功能^[10]。SARS-CoV 的 nsp8 是否也像 p1a-22 一样独立作用还不得而知。

病毒感染细胞后的起始阶段就可以检测到 nsp8 的表达,表现出其对病毒生命活动的启动性作用,究竟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、翻译过程的,以及细胞中何种物质与其作用参与病毒复制,究竟 nsp9 和 nsp8 之间的作用如何、是否以膜相关复合体的形式存在等问题,还有待进一步探讨。本实验中我们获得了 nsp8 的可溶性蛋白和多克隆抗血清,为下一步对这些问题的研究奠定了基础。

参考文献

[1] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 2003,

361 1319~ 1325

[2] Fouchier R A, Kuiken T, Schutten M, et al. Aetiology Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 2003, 423: 240

[3] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300: 1394~ 1399

[4] Mana M A, Jones S J, Astell C R, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, 300: 1399 ~ 1404

[5] Thiel V, Ivanov K A, Putics A, et al. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2305~ 2315

[6] 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 Mol Biol*, 2003, 331: 991~ 1004

[7] Prentice E, McAuliffe J, Lu X T, et al. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J Virol*, 2004, 78: 9977~ 9986

[8] Sutton G, Fry E, Carter L, et al. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus: structure and functional insights. *Structure*, 2004, 12: 341~ 353

[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 Virol*, 2003, 77: 10515~ 10527

[10] Bost A G, Camahan R H, Lu X T, et al. Four proteins processed from the replicase gene polypeptide of mouse hepatitis virus colocalize in the cell periphery and adjacent to sites of virion assembly. *J Virol*, 2000, 74: 3379~ 3387

Prokaryotic Expression of SARS Coronavirus nsp8 Replicase

LU Jia-sen^{1,3} CHEN Shu-hong^{1,3} LU Hua-ran¹ MENG Qing-wen¹ PANG Hai² KONG Xian-gang¹
(1 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, CAAS Harbin 150001, China)
(2 Medical College, Tsinghua University Beijing 100084, China)
(3 Veterinary Medicine College, Northeast Agriculture University Harbin 150030, China)

Abstract The gene of nonstructural protein 8 of SARS-coronavirus (SARS-CoV) was amplified using PCR from the reverse transcription product of SARS-CoV genome RNA, and was inserted into the multiple cloning sites of the expression vector pGEX-6p-1. Recombinant plasmid pNSP8E was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and was induced with IPTG to express the specific soluble fusion protein. The purified nsp8 protein was harvested by affinity chromatography and digested with preScission protease. Polysarum against the nsp8 protein was raised in rabbit. The functional analysis of nsp8 in the infected cell will be performed, and it will also be used to detect protein to protein reaction *in vitro*.

Key words SARS coronavirus (SARS-CoV) Replicase Expression