



新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核衣壳蛋白(N蛋白)的表达研究

鞠守勇

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:截止 2020 年 4 月 12 日,全球感染新型冠状病毒人数已经达到 170 多万人,累计死亡人数达到 10 万多人。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核衣壳蛋白(N蛋白)是 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体快速检测试剂卡的核心原材料。文章优化了大肠杆菌中大量表达 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法,为 SARS-CoV-2 N 蛋白的大规模生产奠定了基础,将为 SARS-CoV-2 抗体快速检测试剂的生产降低成本。

关键词:新型冠状病毒;N 蛋白;抗体快速检测技术

104

武汉职业技术学院学报 2020 年第十九卷第二期(总第一百零六期)

中图分类号: R446

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2020) 02-0104-04

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)为一种新发现的冠状病毒,截至 2020 年 4 月 12 日,全球已经 211 个国家爆发新型冠状病毒疫情,感染人数已经达到 170 多万人,累计死亡人数达到 10 万多人^[1]。2020 年 2 月 11 日,国际病毒分类委员会(ICTV)将新型冠状病毒正式命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2),世界卫生组织(WHO)将这一病毒导致的疾病正式命名为 COVID-19^[2]。SARS-CoV-2 属于冠状病毒 β 属,其遗传物质是正义单链 RNA, RNA 基因组包含 29,891 个核苷酸,与 2003 年的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)的同源性为 82%^[3]。SARS-CoV-2 的结构蛋白主要包括刺突糖蛋白(S 蛋白)、包膜糖蛋白(E 蛋白)、膜糖蛋白(M 蛋白),和核衣壳蛋白(N 蛋白),其中 S 蛋白与宿主细胞血管紧张素转换酶 2(ACE2)结合从而进入宿主细胞内^[4]。

SARS-CoV-2 中 N 蛋白与病毒基因组 RNA 相

互缠绕形成病毒核衣壳,在病毒 RNA 的合成过程中发挥着重要的作用^[5]。同时,N 蛋白相对保守,在病毒的结构蛋白中所占比例最大,感染早期机体就能产生抗 N 蛋白的高水平抗体,可以利用 N 蛋白建立快速检测 SARS-CoV-2 血清抗体方法^[6]。国家卫生健康委发布的《新型冠状病毒感染肺炎的诊疗方案(试行第七版)》中,增加血清学检测作为确诊依据^[6]。N 蛋白是 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体快速检测试剂卡的核心原材料,N 蛋白的产量多少也将会制约着 SARS-CoV-2 抗体检测试剂卡的生产。

本研究优化了大肠杆菌中大量表达 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法,优化的表达条件为:菌体过夜活化至稳定期,转接 37℃培养至 OD 值 0.8~1.0,加入 0.4 mM IPTG 诱导,37℃继续培养 4 h。本研究为 SARS-CoV-2 N 蛋白的大规模生产奠定了基础,将为 SARS-CoV-2 抗体检测试剂卡的生产降低成

收稿日期:2020-04-13

基金项目:湖北省自然科学基金“新型杀线虫微生物——粪产碱菌杀根结线虫活性蛋白质的挖掘及基因克隆”(项目编号:2018CFB529);湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目“有机废弃物生物处理与资源化利用技术”(项目编号:T201535);武汉职业技术学院博士科研基金项目“食品中青霉素类抗生素残留快速检测试剂盒的研制”(项目编号:2016BS005)。

作者简介:鞠守勇(1981-),男,山东泰安人,博士,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,研究方向:基因工程。

本。

一、材料与方法

(一)材料与仪器

大肠杆菌 *E.coli* BL21(ED3)(pET28a(+)-N)来自广东省实验动物监测所丛锋老师惠赠;限制性内切酶购自大连宝生物有限公司;蛋白质 Marker,BSA 购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司;氯化钠、Tirs 盐酸等常规生化试剂 购于国药集团;Western 杂交相关试剂 购于上海碧云天生物技术有限公司。镍柱填料购于康为世纪生物科技有限公司;Bradford 蛋白质定量检测试剂卡 购于上海生工生物技术有限公司。LB 培养基:胰蛋白胨 10g/L,酵母提取物 5g/L,氯化钠 10 g/L,pH 值 7.0~7.4,121℃灭菌 30min。标准湿式转膜 美国 Bio-rad

公司;Eppendorf 5415D 离心机 德国 Eppendorf 公司;恒温培养箱 广州医疗器械厂;凝胶成像系统 3Y GAS-2000 美国柯达公司;电泳仪 DYY-11 北京六一仪器厂;恒温恒湿箱 摇床 武汉瑞华仪器设备公司。

(二)实验方法

1. 质粒提取

将 *E.coli* BL21(ED3)(pET28a(+)-N)在平板上挑取单菌落,接种含有卡拉霉素的 LB 液体培养基中,37℃过夜活化,将菌液按 1%比例加入新鲜的卡拉霉素 LB 液体培养基,37℃,200 r/min 培养至 OD0.8~1.0,质粒提取方法参见分子克隆实验指南^[7]。

2. N 蛋白 N 蛋白的诱导表达

将 *E.coli* BL21(ED3)(pET28a-N)在平板上挑取单菌落,接种含有卡拉霉素的 LB 液体培养基中,

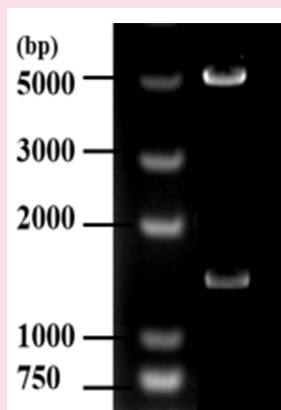


图1 pET28a(+)-N 用 *Nco* I, *Xho* I 酶切片段

(M 是 DNA 分子量标准,1,2 是 pET28a(+)-N 用 *Nco* I, *Xho* I 酶切片段)

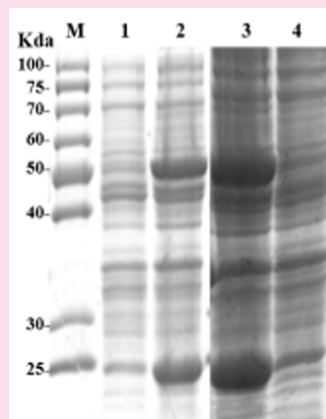


图2 SDS-PAGE 检测诱导表达的 N 蛋白质

(M: 蛋白分子量标准,1:37℃未诱导,2:37℃诱导,3:16℃未诱导,4:16℃诱导)

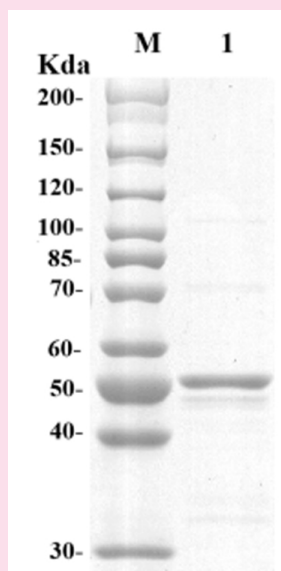


图3 SDS-PAGE 检测提纯的 N 蛋白质

(M: 蛋白分子量标准,1:提取的 N 蛋白)

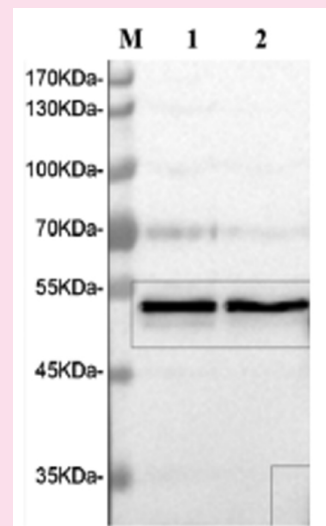


图4 Western 杂交验证诱导提纯的 N 蛋白质

(M: 蛋白分子量标准,1:37℃诱导提取 N 蛋白,2:16℃诱导提取 N 蛋白)

37℃过夜活化,将菌液按 1%比例加入新鲜的卡拉霉素 LB 液体培养基,37℃,200r/min 培养至 OD0.8~1.0,加入 IPTG 诱导 250 r/min,37℃或 16℃培养,将培养瓶置于冰上 5min;4℃,12000 r/min 离心收集菌体,预冷的 ddH₂O 重悬菌体沉淀,再次离心收集菌体,备用。

3. N 蛋白的纯化

用 4℃的 Soluble Binding Buffer (10mmol/L 咪唑,NaCl0.5 mol/L,20 mmol/L Tris-HCl,pH=7.9)重悬菌体,置于冰上超声波破碎至悬液变澄清;4℃,12000r/min 离心 60 min,收集上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后缓缓加入到 Ni 琼脂糖凝胶柱中,随后使用 15 倍柱体积的 Soluble Binding Buffer 冲洗柱子,洗脱杂蛋白;然后用 Elution Buffer(500 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH=7.9)洗脱柱子,收集洗脱液。随后 10KDa 超滤管去除高浓度咪唑,PBS 重新溶解得到纯化蛋白质 N 蛋白。

4. Western blot

纯化的 N 蛋白加入等体积的 SDS-PAGE 2× sample buffer,100 处理 25min,点样进行 SDS-PAGE 和 Western 杂交,方法参见分子克隆实验指南^[7]。

二、结果与分析

(一)E.coli BL21(ED3)(pET28a(+)-N)菌株的验证

证

提取 E.coli BL21 (ED3)(pET28a (+)-N) 质粒经 Nco I, Xho I 酶切验证为 5.3kb,1.5kb 符合预期 (图 1)。测序结果表明 N 基因序列与预期序列完全一致。

(二)N 蛋白的诱导表达温度的优化

大肠杆菌重组蛋白质诱导表达通常在 37℃或 16℃下进行,分别在 37℃或 16℃下,0.4 mM IPTG 诱导表达蛋白质 3h(37℃),14h(16℃),SDS-PAGE 鉴定显示该蛋白质得到的表达,蛋白质分子量约为 50Kda,大小符合预期,如图 2 所示,N 蛋白在 37℃和 16℃都有表达。随后按照方法 1.2.3 方法,纯化 N 蛋白(图 3),用 6XHis 单抗做 Western 杂交进一步确认是 N 蛋白(图 4)。

(三)N 蛋白质诱导条件的优化

取 6 支 500mL 的三角瓶,每瓶分装 LB 培养基 50 mL,转接培养至 OD6000.8 时,分别加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6mmol/L 的 IPTG,37℃振荡培 4 h 或 16℃振荡培 14 h。用按照方法 1.2.3 方法,纯化 N 蛋白,Bradford 方法测定蛋白质的浓度。如图 5 所示,结果发现在 37℃下 IPTG 的浓度在 0.4mmol/L 的时候 N 蛋白的得率最高。

三、结果与讨论

根据 2020 年 2 月 27 日《Science》杂志的报道,

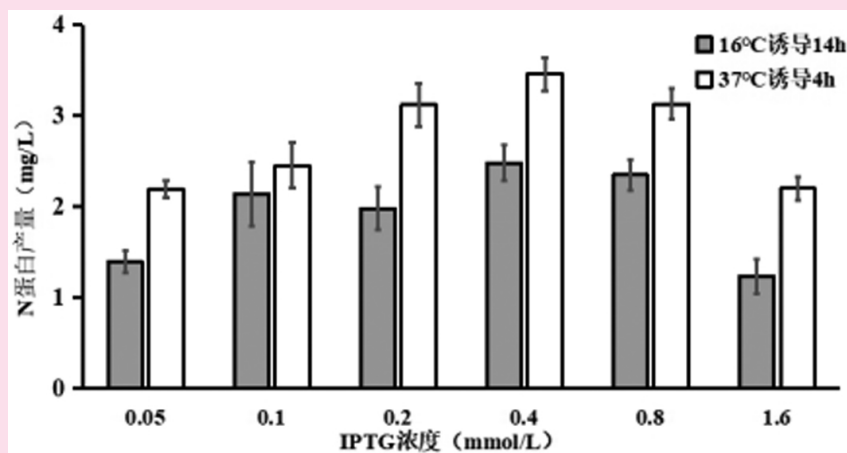


图 5 N 蛋白质诱导条件的优化

抗体检测可用于流行病学的快速调查,新加坡研究人员在一名核酸检测阴性的无症状接触者体内检测出 SARS-CoV-2 抗体,说明抗体检测对于追踪隐性感染传染源具有重要意义^[8]。在当前疫情防控工作,无症状感染者将是筛查的重点,SARS-CoV-2 IgM/IgG 快速检测试剂卡是一种快速判断是否是无症状感染者的一种重要血清学检测方法,N 蛋白是 SARS-CoV-2 IgM/IgG 快速检测试剂卡的重要核心

原材料^[9]。

截止 3 月 31 日,国内已经有多家公司成功表达 SARS-CoV-2 中 N 蛋白,很多都是在真核表达系统中完成,对于 N 蛋白来说真核表达系统当然表达效果和活性更好,但是相对来说成本也更加高;如果 N 蛋白仅仅用于 SARS-CoV-2 IgM/IgG 检测试剂卡来,大肠杆菌表达的 N 蛋白产量高,成本低,将会极大的降低 SARS-CoV-2 的筛查成本。本研究优化了

大肠杆菌中大量表达 SARS-CoV-2 N 蛋白的方法, 为 SARS-CoV-2 N 蛋白的大规模生产奠定了基础, 将为 SARS-CoV-2 抗体快速检测试剂卡的生产降低成本。

参考文献:

- [1] 人民网. 新冠疫情实时动态[EB/OL].<http://health.people.com.cn/GB/26466/431463/431576/index.html>,2020-04-13.
- [2] 人民网. 世卫组织正式命名新冠病毒所致疾病为“COVID-19”[EB/OL].<http://health.people.com.cn/GB/n1/2020/0213/c14739-31584524.html>,2020-02-13.
- [3] LU R J, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. Lancet, 2020, (10224): 565-74.
- [4] YAN R, ZHANG Y, LI Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [J]. Science, 2020, (6485): 1444-8.
- [5] 郑培明, 崔发财, 张福明, 等. 新型冠状病毒 IgM/IgG 抗体不同检测方法在新型冠状病毒感染中的临床应用评价[J]. 检验医学, 2020, (1): 1-6.
- [6] 人民网. 《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》发布[EB/OL].<http://health.people.com.cn/n1/2020/0304/c14739-31616706.html>, 2020-04-13.
- [7] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [8] Normile D. Singapore claims first use of antibody test to track coronavirus infections [EB/OL]. <https://www.sciencemag.org/news/2020/02/singapore-claims-first-use-antibody-test-track-coronavirus-infections>, 2020-02-27.

[责任编辑: 高小娥]

Research on Expression of Nucleocapsid Protein (N Protein) of New Coronavirus (SARS-CoV-2)

JU Shou-yong

(School of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: As of April 12, 2020, the number of people infected with the new coronavirus has reached more than 1.7 million, and the cumulative number of deaths has reached more than 100,000. The new coronavirus nucleocapsid protein (N protein) is the core raw material of the SARS-CoV-2 IgM / IgG antibody rapid detection reagent card. The method for optimizing the large-scale expression of SARS-CoV-2 N protein in *E. coli* has laid a foundation for the large-scale production of SARS-CoV-2 N protein, which will reduce the cost of the production of SARS-CoV-2 antibody rapid detection reagents.

Keywords: new coronavirus; N protein; rapid antibody detection technology