

SARS冠状病毒 S 蛋白受体结合结构域的表达及其表位作图*

华荣虹 童光志** 王云峰 周艳君

(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)

摘要 严重急性呼吸综合征 (SARS) 是一种新出现的人类传染病, 该病的病原是 SARS 冠状病毒(SARS-CoV). S 蛋白是 SARS 冠状病毒的一种主要结构蛋白, 它在病毒与宿主细胞受体结合以及诱导机体产生中和抗体中起重要作用. 研究表明 S 蛋白与受体结合的核心区域为第 318~510 氨基酸残基的片段. 首先克隆并用 pGEX-6p-1 载体融合表达了该受体结合结构域, 并且通过蛋白质印迹分析表明, 该受体结合结构域融合蛋白能被 SARS 康复患者血清和 S 蛋白特异的单克隆抗体所识别. 为了对这一区域进行抗原表位作图, 进一步设计了一套 23 个覆盖受体结合结构域的长 16 个氨基酸残基的部分重叠短肽, 并进行了 GST 融合表达. 用免疫动物血清和单克隆抗体 D3D1 对 23 个融合蛋白进行蛋白质印迹和 ELISA 免疫反应性分析, 结果鉴定出两个抗原表位 SRBD3 (F₃₃₄PSVYAWERKKISNCV₃₄₉) 和表位 D3D1 (K₄₄₇LRPFERDI₄₅₅). 其结果对进一步分析 S 蛋白结构与功能以及诊断试剂和基因工程疫苗的研究有一定意义.

关键词 严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV), 纤突蛋白(S 蛋白), 表位

学科分类号 Q78

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS), 也称非典型肺炎, 是一种急性、致死性呼吸道传染病. 该病最先于 2002 年出现在我国广东地区, 在 2002~2003 年的流行暴发期间, 世界范围内有 8 000 余人感染并导致 800 余人死亡. 该病的病原是一种新型的冠状病毒, 即 SARS 冠状病毒^[1-3]. S 蛋白是冠状病毒表面的一种重要的结构与功能蛋白, 它决定病毒的细胞嗜性, 与宿主细胞受体结合, 在病毒与细胞膜融合并入侵细胞过程中起着重要的作用. S 蛋白有很好的免疫原性, 能诱导机体产生中和抗体, 在机体的抗病毒免疫中起重要作用^[4,5]. SARS 冠状病毒 S 蛋白有 1 255 氨基酸残基, 其中 12~672 氨基酸残基是 S 蛋白的 S1 部分, 其中 S 蛋白受体结合结构域(spike protein receptor binding domain, SRBD)为 318~510 氨基酸残基区域, 与细胞受体 ACE2 结合^[6-10]. 本研究克隆表达了 SRBD 片段, 结果表明, 原核表达产物可被抗 SARS 冠状病毒血清识别. 并且利用一组覆盖该区域的短肽融合蛋白进一步对受体结合结构域的免疫特性进行了研究.

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pGEX-6P-1、大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 均为本实验室保存. 含 SARS 冠状病毒 S 基因质粒 pBLUEss 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所步志高博士提供.

1.2 酶与标记物

限制性内切酶 *Bam*H I, *Xho* I, *Eco*R I, T4DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品; IPTG, AP 标记抗鸡 IgG, HRP 标记抗人 IgG 为 Promega 公司产品; 凝胶回收试剂盒为华舜生物工程有限公司产品.

1.3 抗 SARS-CoV 阳性血清

SARS 患者康复血清由华南农业大学廖明博士和张桂红博士惠赠, 已经灭活处理. 灭活 SARS 冠状病毒高度免疫鸡血清由哈尔滨兽医研究所 SARS

*黑龙江省博士后基金资助项目(HPD2003045).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0451-82734181, E-mail: gztong@hvri.ac.cn

收稿日期: 2005-04-18, 接受日期: 2005-05-31

研究小组提供. SARS 冠状病毒 S 蛋白特异单克隆抗体 D3D1 由本实验室制备^[1].

1.4 pGEX-SRBD 融合表达载体的构建与表达

参照已发表的 SARS 冠状病毒 Urbani 株基因组序列(NCBI 序列号: AY278741), 设计两条引物. pSRBDs: 5' CGCGGATCCAATATTACAAA-CTTGTGTCC 3'; pSRBDa: 5' TAACTCGAGAA-CCGTGGCCGGTGCATTTA 3'. 在正向引物的 5' 端引入 *Bam*H I 位点, 在反向引物的 5' 端引入 *Xho* I 位点. 引物由上海博亚生物技术有限公司合成. 该引物扩增产物编码受体结合结构域, 318~510 氨基酸残基的片段. PCR 反应体系为: H₂O 33 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl, 25 pmol/L 上下游引物各 1 μl, 25 mmol/L dNTP 4 μl, 模板 DNA 5 μl, Ex-Taq DNA 聚合酶 1 μl, 总体积 50 μl. PCR 反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 35 次; 72℃ 5 min, 4℃ 保存. PCR 产物经 *Bam*H I, *Xho* I 双切回收后 -20℃ 存放备用, *Bam*H I, *Xho* I 双酶切质粒 pGEX-6P-1, 回收大片段, 凝胶回收按试剂盒说明进行, T4DNA 连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5α, 重组子经酶切鉴定后命名为 pGEX-SRBD, 再将重组质粒转化感受态大肠杆菌 BL21. 大肠杆菌感受态的制备, 质粒的连接转化按常规方法进行. 将表达菌种接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜后, 按 1:100 接种于新鲜 2×YT 培养基中, 继续培养至对数生长期 ($A_{600}=0.5 \sim 0.7$), 加 IPTG 诱导, 培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬, 超声波裂解后 12 000 r/min 离心分离上清和沉淀, 12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳检测表达情况.

1.5 短肽融合蛋白的设计与表达纯化

为了对 S 蛋白受体结合结构域 (318~510 氨基酸残基) 这一长 193 氨基酸残基(a.a.)的片段 SRBD 进行抗原表位作图, 设计了一套覆盖整个 SRBD 的短肽, 命名为 SRBD1~SRBD23, 这些短肽长为 16 个氨基酸(SRBD23 为 17 个氨基酸), 有 8 个氨基酸重叠 (表 1). 为了表达这些短肽, 设计合成了 23 对寡核苷酸链. 在编码链的 5' 端引入 *Bam*H I 位点, 3' 端引入 *Xho* I 位点. 反义链与编码链互补, 且退火后形成的双链 DNA 正向为 *Bam*H I 粘性末端, 反向为 *Xho* I 粘性末端, 可直接与酶切线性化处理的载体相连接. 寡核苷酸编号及序列如表 2 所示. 寡核苷酸由上海博亚生物技术有限公司合成.

Table 1 Designed short peptides spanning the receptor binding domain

Name	Location (a.a.*)	Sequence
SRBD1	318 ~ 333	NITNLCPFGEVFNATK
SRBD2	326 ~ 341	GEVFNATKFPSVYAW
SRBD3	334 ~ 349	FPSVYAWERKKISNCV
SRBD4	342 ~ 357	RKKISNCVADYSVLYN
SRBD5	350 ~ 367	ADYSVLYNSTFFSTFK
SRBD6	358 ~ 373	STFFSTFKCYGVSATK
SRBD7	366 ~ 384	CYGVSATKLNDLCFSN
SRBD8	374 ~ 389	LNDLCFSNVYADSFVV
SRBD9	382 ~ 397	VYADSFVVKGDDVRQI
SRBD10	390 ~ 405	KGDDVRQIAPGQTGVI
SRBD11	398 ~ 413	APGQTGVIADYNYKLP
SRBD12	406 ~ 421	ADYNYKLPPDFMGCVL
SRBD13	414 ~ 429	DDFMGCVLAWNTRNID
SRBD14	422 ~ 437	AWNTRNIDATSTGNYN
SRBD15	430 ~ 445	ATSTGNYNYKYRYLRH
SRBD16	438 ~ 453	YKYRYLRHKGKLRPFER
SRBD17	446 ~ 461	GKLRPFERDISNPFS
SRBD18	454 ~ 469	DISNPFSPDGKPCCTP
SRBD19	462 ~ 477	PDGKPCPPALNCYWP
SRBD20	470 ~ 485	PALNCYWPLNDYGFYT
SRBD21	478 ~ 493	LNDYGFYTTTGIGYQP
SRBD22	486 ~ 501	TTGIGYQPYRVVLSF
SRBD23**	494 ~ 510	YRVVLSFELLNAPATV

*a.a., amino acid; **SRBD1~SRBD22 are all 16 a.a., SRBD23 is 17a.a.

1.6 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化

*Bam*H I, *Xho* I 双切质粒 pGEX-6P-1, 回收双切线性化载体; 琼脂糖凝胶回收按试剂盒说明进行; T4DNA 连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5α, 重组子经酶切鉴定后命名为 pGEX-SRBD1 至 pGEX-SRBD23, 各重组质粒送上海博亚生物技术有限公司测序以验证序列. 将重组质粒转化感受态大肠杆菌 BL21. 大肠杆菌感受态的制备, 质粒的连接转化按常规方法进行. 将表达菌种接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜后, 按 1:100 接种于新鲜 2×YT 培养基中, 继续培养至对数生长期 ($A_{600}=0.5 \sim 0.7$), 加 IPTG 诱导, 培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬, 超声波裂解后 12 000 r/min 离心分离上清和沉淀. 12% SDS-PAGE 电泳检测表达情况. 短肽融合蛋白用谷胱甘肽 sepharose 4B RediPack 亲和层析柱

Table 2 Synthesized DNA sequences which encoding the short peptides.

No.	Name	Sequence
1	Srbd-1s	5' gATCCAATATTACAAACTTgTgTCCTTTTggAgAggTTTTTAATgCTACTAAATAAC 3'
	Srbd-1a	5' TCgAgTTATTTAgTAgCATTAAAAACCTCTCCAAAAggACACAAGTTTgTAATATTg 3'
2	Srbd-2s	5' gATCCggAgAggTTTTTAATgCTACTAAATTCCTTCTgTCTATgCATgggAgTAAC 3'
	Srbd-2a	5' TCgAgTTACTCCCATgCATAgACAgAAgggAATTAgTAgCATTAAAAACCTCTCCg 3'
3	Srbd-3s	5' gATCCTTCCCTTCTgTCTATgCATgggAgAgAAAAAAATTTCTAATTgTgTTTAAC 3'
	Srbd-3a	5' TCgAgTTAAACACAATTAgAAATTTTTTTCTCTCCCATgCATAgACAgAAgggAAg 3'
4	Srbd-4s	5' gATCCAgAAAAAAATTTCTAATTgTgTTgCTgATTACTCTgTgCTCTACAACATAAC 3'
	Srbd-4a	5' TCgAgTTAgTTgTAgAgCACAgAgTAATCAGCAACACAATTAgAAATTTTTTTCTg 3'
5	Srbd-5s	5' gATCCgCTgATTACTCTgTgCTCTACAACCAACATTTTTTCAACCTTTAAgTAAC 3'
	Srbd-5a	5' TCgAgTTACTTAAAgTTgAAAAAAATgTTgAgTTgTAgAgCACAgAgTAATCAGCg 3'
6	Srbd-6s	5' gATCCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAgTgCTATggCgTTTCTgCCACTAAgTAAC 3'
	Srbd-6a	5' TCgAgTTACTTAgTggCAGAAACgCCATAgCACTTAAAgTTgAAAAAAATgTTgAg 3'
7	Srbd-7s	5' gATCCTgCTATggCgTTTCTgCCACTAAgTTgAATgATCTTTgCTTCTCCAATTAAC 3'
	Srbd-7a	5' TCgAgTTAATTggAgAAgCAAAgATCATTCAACTTAgTggCAGAAACgCCATAgCag 3'
8	Srbd-8s	5' gATCCTTgAATgATCTTTgCTTCTCCAATgTCTATgCAGATTCTTTTgTAgTCTAAC 3'
	Srbd-8a	5' TCgAgTTAgACTACAAAAGAACTCTgCATAgACATTggAgAAgCAAAgATCATTCAAG 3'
9	Srbd-9s	5' gATCCgTCTATgCAGATTCTTTTgTAgTCAAgggAgATgATgTAAGACAAATATAAC 3'
	Srbd-9a	5' TCgAgTTATATTgTCTTACATCATCTCCCTTgACTACAAAAGAACTCTgCATAgACg 3'
10	Srbd-10s	5' gATCCAAgggAgATgATgTAAGACAAATAgCgCCAggACAAACTggTgTTATTTAAAC 3'
	Srbd-10a	5' TCgAgTTAAATAACACCAGTTTgTCCTggCgCTATTTgTCTTACATCATCTCCCTTg 3'
11	Srbd-11s	5' gATCCgCgCCAggACAAACTggTgTTATTgCTgATTATAATTATAAATTgCCATAAC 3'
	Srbd-11a	5' TCgAgTTATggCAATTTATAATTATAATCAgCAATAACACCAGTTTgTCCTggCgCg 3'
12	Srbd-12s	5' gATCCgCTgATTATAATTATAAATTgCCAgATgATTTCATgggTTgTgTCCTTTAAAC 3'
	Srbd-12a	5' TCgAgTTAAAggACACAACCCATgAAATCATCTggCAATTTATAATTATAATCAGCg 3'
13	Srbd-13s	5' gATCCgATgATTTCATgggTTgTgTCCTTgCTTggAATACTAggAACATTgATTAAC 3'
	Srbd-13a	5' TCgAgTTAATCAATgTTCCTAgTATTCCAAGCAAggACACAACCCATgAAATCATCg 3'
14	Srbd-14s	5' gATCCgCTTggAATACTAggAACATTgATgCTACTTCAACTggTAATTATAATTAAAC 3'
	Srbd-14a	5' TCgAgTTAATTATAATTACCAGTTgAAgTAgCATCAATgTTCCTAgTATTCCAAGCg 3'
15	Srbd-15s	5' gATCCgCTACTTCAACTggTAATTATAATTATAAATATAggTATCTTAgACATTAAC 3'
	Srbd-15a	5' TCgAgTTAATgTCTAAgATACCTATATTTATAATTATAATTACCAGTTgAAgTAAGCg 3'
16	Srbd-16s	5' gATCCTATAAATATAggTATCTTAgACATggCAAgCTTAggCCCTTgAgAgATAAC 3'
	Srbd-16a	5' TCgAgTTATCTCTCAAAgggCCTAAgCTTgCCATgTCTAAgATACCTATATTTATAg 3'
17	Srbd-17s	5' gATCCggCAAgCTTAggCCCTTgAgAgAgACATATCTAATgTgCCTTTCTCTAAAC 3'
	Srbd-17a	5' TCgAgTTAggAgAAAggCACATTAgATATgTCTCTCTCAAAgggCCTAAgCTTgCCg 3'
18	Srbd-18s	5' gATCCgACATATCTAATgTgCCTTTCTCCCTgATggCAAACCTTgCACCCATAAC 3'
	Srbd-18a	5' TCgAgTTATggggTgCAAggTTTgCCATCAGgggAgAAAggCACATTAgATATgTCg 3'
19	Srbd-19s	5' gATCCCCTgATggCAAACCTTgCACCCACCTgCTCTTAATTgTTATTggCCATAAC 3'
	Srbd-19a	5' TCgAgTTATggCCAATAACAATTAAgAgCAGgTggggTgCAAggTTTgCCATCAGgg 3'
20	Srbd-20s	5' gATCCCCTgCTCTTAATTgTTATTggCCATTAAATgATTATggTTTTTACACCTAAC 3'
	Srbd-20a	5' TCgAgTTAggTgTAAAAACCATAATCATTTAATggCCAATAACAATTAAgAgCAGgg 3'
21	Srbd-21s	5' gATCCTTAAATgATTATggTTTTTACACCACTACTggCATTggCTACCAACCTTAAC 3'
	Srbd-21a	5' TCgAgTTAAAgTgTgTAgCCAATgCCAgTAgTggTgTAAAAACCATAATCATTTAAg 3'
22	Srbd-22s	5' gATCCACTACTggCATTggCTACCAACCTTACAgAgTTgTAgTACTTTCTTTTAAAC 3'
	Srbd-22a	5' TCgAgTTAAAAAAGAAgTACTACAACCTCTgTAAGgTTggTAgCCAATgCCAgTAgTg 3'
23	Srbd-23s	5' gATCCTACAgAgTTgTAgTACTTTCTTTTAACTTTTAAATgCACCGgCCAggTTTAAC 3'
	Srbd-23a	5' TCgAgTTAAACCgTggCCggTgCATTTAAAgTTCAAAAGAAAgTACTACAACCTCTgTAg 3'

(Pharmacia Biotech)纯化, 操作步骤按说明进行. 纯化后测定蛋白质含量, -20°C 保存备用.

1.7 鼠抗融合蛋白 GST-SRBD 和 GST-SRBD3 血清的制备

GST-SRBD 包涵体抗原按以下方法纯化, 表达菌种经诱导后进行超声波裂解, 裂解液经 12 000 r/min 离心分离上清和沉淀, 包涵体沉淀再经 PBS 悬浮和超声波洗涤 3 次, 最后一次沉淀用 1/100 原菌液体积的 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液溶解, 进行 12%SDS-PAGE 电泳切胶回收相应的蛋白质条带. 加 PBS 充分研磨后与等体积弗氏佐剂充分乳化. 第一次免疫用完全弗氏佐剂乳化液腹部皮下注射免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 4 只. 每隔两周用不完全弗氏佐剂乳化液加强免疫, 第二次加强免疫后 10 天采血分离血清, -20°C 保存备用.

融合蛋白 GST-SRBD3 的纯化按前文所述方法进行. 首先用纯化融合蛋白与完全弗氏佐剂等体积混合乳化, 腹部皮下注射免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 4 只, 每隔两周用纯化融合蛋白与不完全弗氏佐剂等体积乳化液加强免疫, 第二次加强免疫后 10 天采血分离血清, -20°C 保存备用.

1.8 蛋白质印迹

1.8.1 检测融合蛋白 GST-SRBD 与 SARS 康复病人血清和单克隆抗体 D3D1 的免疫反应性. 样品经 SDS-PAGE 后, 转印至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂乳 4°C 封闭过夜, TTBS 洗 3 遍, 浸入 1:100 稀释的 SARS 阳性血清中, 室温作用 2 h, TTBS 洗 3 遍后浸入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体, 室温作用 1 h, 洗涤 3 次后用 DAB 显色.

1.8.2 检测短肽融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23 与 SARS 康复病人血清和免疫鸡血清的免疫反应性. 样品经 SDS-PAGE 电泳后, 转印至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂乳 4°C 封闭过夜, TTBS 洗三遍, 浸入 1:100 稀释的 SARS 阳性血清中, 室温作用 2 h, TTBS 洗 3 遍后浸入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体, 室温作用 1 h, 洗涤 3 次后用 DAB 显色. 与免疫鸡血清作用时鸡血清为 1:200 稀释, 二抗为 1:5 000 稀释的碱性磷酸酶标记羊抗鸡 IgG 抗体, 用 BCIP/NBT 显色系统显色.

1.9 ELISA

1.9.1 检测短肽融合蛋白 GST-SRBD1~GST-SRBD23 与单克隆抗体 D3D1 的免疫反应性. 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将超声裂解物上清经 50 倍稀释, 以 100 μL /孔包被 ELISA 板,

4°C 过夜, 用 5% 脱脂乳室温封闭 3 h. 封闭后用 PBST (PBS 含 0.1% Tween 20) 洗 3 遍, 加入 10 000 倍稀释的 D3D1 腹水, 37°C 作用 1 h, PBST 洗 5 遍; 加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体, 37°C 作用 1 h, PBST 洗 7 遍, 加入 OPD 显色液显色 15 min, 50 μL /孔 2 mol/L H_2SO_4 终止, 490 nm 波长测量吸收值.

1.9.2 检测鼠抗融合蛋白 GST-SRBD3 血清与真核表达全长 S 蛋白的免疫反应性. 表达 SARS 冠状病毒全长 S 蛋白的昆虫杆状病毒感染的 Sf9 细胞裂解物由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所步志高博士提供. 裂解物经 100 倍稀释包被 ELISA 板, 一抗为倍比稀释的鼠抗 GST-SRBD3 血清. 其他步骤同上文所述.

2 结 果

2.1 受体结合结构域的融合表达与免疫印迹分析

PCR 产物克隆至表达载体 pGEX-6p-1 后经测序表明与 Urbani 株对应序列基本一致, 与 Urbani 株序列比较有两个碱基的突变, 分别为 1032A-G 与第 1035T-C 位. 两个位点的突变均为同义突变, 故未作更正突变. 重组质粒 pGEX-SRBD 转化宿主菌 BL21 后, 用 0.1 mmol/L IPTG 37°C 诱导 4 h, 经 12% SDS-PAGE 分析, 表明目的基因以包涵体的形式表达. 表达产物大小约为 43 ku, 与预期大小一致(图 1). 蛋白质印迹结果表明, 表达融合蛋白 GST-SRBD 能被单克隆抗体 D3D1 和 SARS 病人康

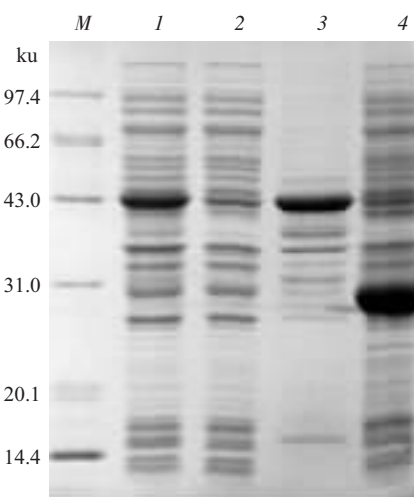


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein GST-SRBD

M: Middle molecular mass marker; 1: Total lysates of induced bacteria; 2: Supernatant of induced bacteria lysates; 3: Sediment of induced bacteria lysates; 4: Induced GST as a control.

复期血清所识别, 如图 2 所示, 箭头所示为 GST-SRBD 条带.

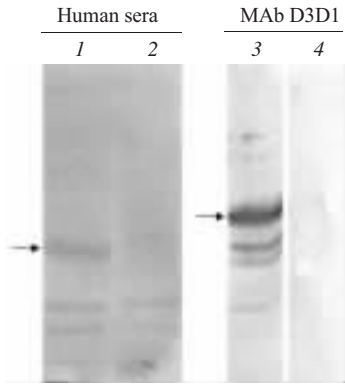


Fig. 2 Western blot analysis of fusion protein GST-SRBD
1 and 3: GST-SRBD; 2 and 4: GST.

2.2 短肽融合蛋白的表达与纯化

编码各短肽的寡核苷酸经退火后克隆至表达载体 pGEX-6p-1, 后经测序检验表明各编码序列完全正确. 重组质粒依次命名为 pGEX-SRBD1~pGEX-SRBD23, 重组质粒转化宿主菌 BL21, 用 0.1 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 4 h 后, 经 SDS-PAGE 分析表明目的基因得到了表达. 诱导产物经超声波裂解后用于 SDS-PAGE 分析或直接用于蛋白质印迹分析和与单克隆抗体的 ELISA 分析. 表达产物均为可溶性蛋白(图 3). 表达产物的纯化按上文所述方法进行, SRBD3 的纯化结果如图 4 所示.

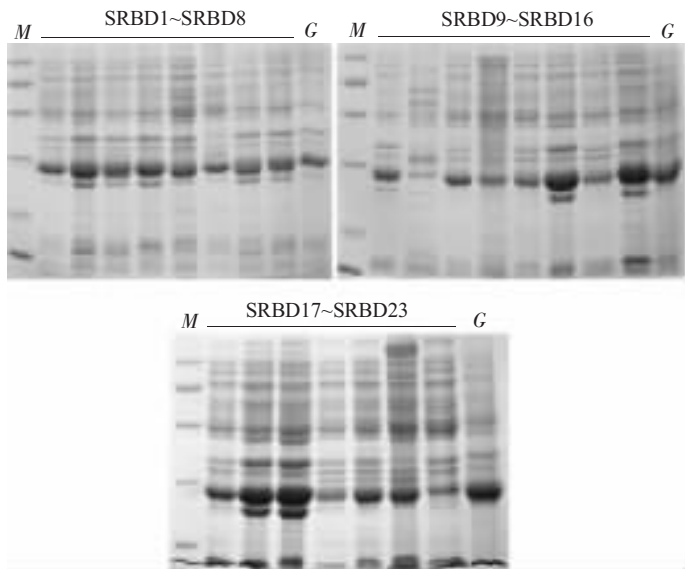


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of short peptide SRBD1 to SRBD23 fusion protein
M: Middle molecular mass marker; G: GST control; SRBD1 ~ SRBD23: Recombinant fusion proteins GST-SRBD1 ~ GST-SRBD23.

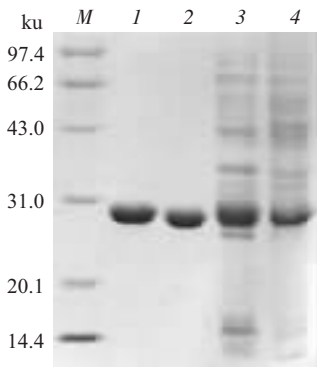


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant fusion protein GST-SRBD3
M: Middle molecular mass marker; 1: Purified protein GST-SRBD3; 2: Purified GST as a control; 3: Total lysates of induced bacteria expressing GST-SRBD3; 4: Total lysates of induced bacteria expressing GST.

2.3 短肽融合蛋白的蛋白质印迹分析与 ELISA 分析

蛋白质印迹结果表明, 表达融合蛋白 GST-SRBD3、GST-SRBD16、GST-SRBD17 能被免疫鸡血清所识别(图 5). ELISA 分析结果表明, GST-SRBD17 能被单克隆抗体 D3D1 识别(图 6).

2.4 SRBD3 的免疫原性

融合蛋白 GST-SRBD3 经纯化免疫小鼠制备了免疫血清. 与真核表达的全长 S 蛋白为抗原的 ELISA 试验表明 SRBD3 能诱导小鼠产生 S 蛋白特异的抗体. 抗体效价均高于 1/640(图 7). 同时, 蛋白质印迹结果表明, 鼠抗 SRBD3 血清能识别变性条件下的 S 蛋白. 以上结果表明 SRBD3 是 S 蛋白上的一个线性抗原表位.

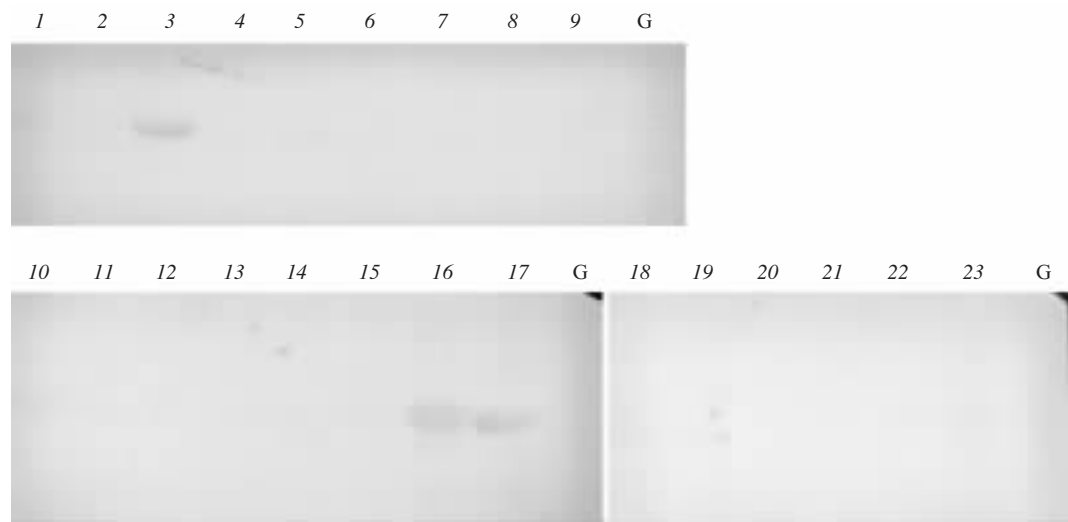


Fig. 5 Western blot analysis of the reactivity of immunized chicken sera to short peptide-fused protein GST-SRBD1 ~ GST-SRBD23
1 ~ 23: Recombinant fusion proteins GST-SRBD1 ~ GST-SRBD23; G: GST control.

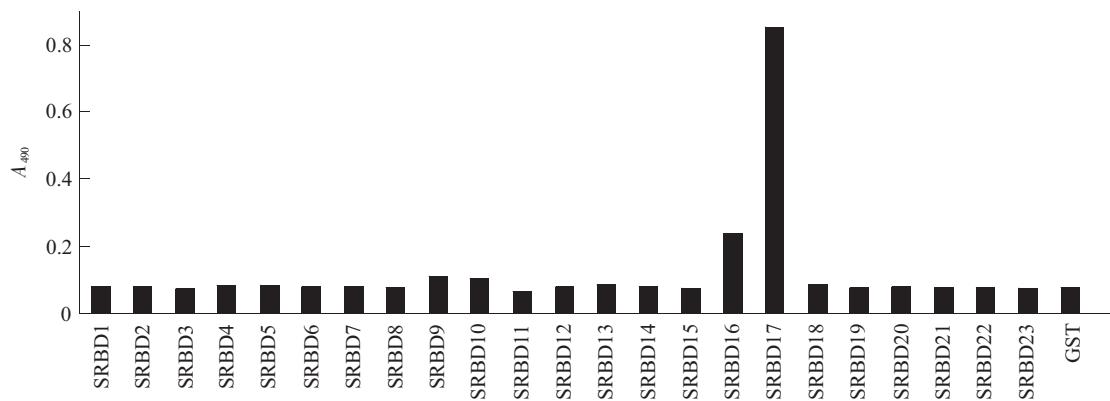


Fig. 6 ELISA analysis of the reactivity of fusion proteins GST-SRBD1 ~ GST-SRBD23 to the monoclonal antibody D3D1

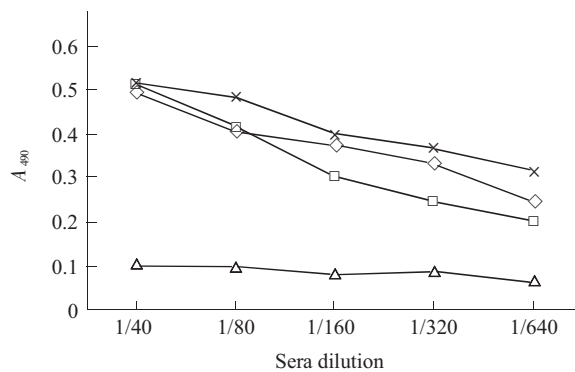


Fig. 7 ELISA analysis of the reactivity of GST-SRBD3 immunized mice sera to recombinant baculovirus expressed full-length spike protein
 $\diamond$ — $\diamond$: Mouse-1; $\square$ — $\square$: Mouse-2; $\times$ — $\times$: Mouse-3; $\triangle$ — $\triangle$: Mask.

2.5 受体结合区抗原表位作图结果

23 个相互重叠且覆盖 SRBD 全长区域的短肽融合蛋白经免疫鸡血清蛋白质印迹和单克隆抗体 D3D1 ELISA 扫描后, GST-SRBD3, GST-SRBD16 和 GST-SRBD17 三个短肽融合蛋白具有免疫反应性. 其中 GST-SRBD16 和 GST-SRBD17 能被单克隆抗体 D3D1 识别, 但 D3D1 与 GST-SRBD16 反应信号较弱而与 GST-SRBD17 反应信号很强. 在以前的实验表明单克隆抗体 D3D1 表位的核心序列为 KLRPFERDI^[11], 在 SRBD16 中包含该序列的前 6 个氨基酸残基, 而 SRBD17 中则完全包含该核心序列的 9 个氨基酸残基, 所以 SRBD16 ~ SRBD17 中的表位即为表位 D3D1. 而此区域另外一个线性抗原表位为 SRBD3 (图 8).

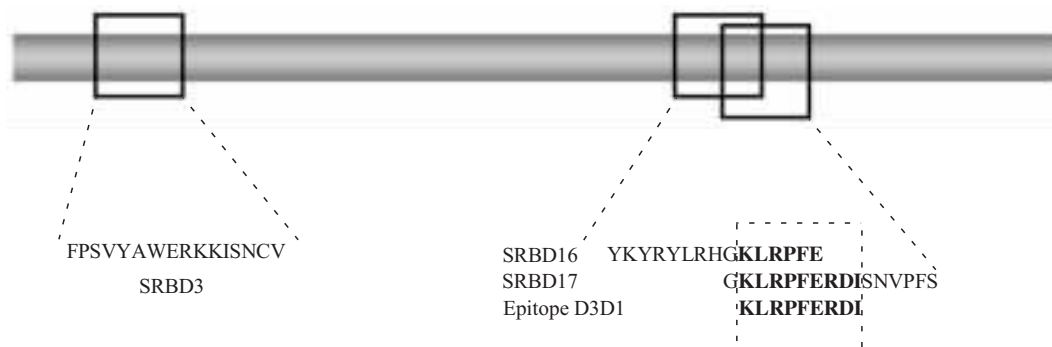


Fig. 8 Schematic diagram of epitope mapping results of spike protein receptor binding domain

3 讨 论

SARS冠状病毒 S 蛋白同其他冠状病毒 S 蛋白一样, 是病毒粒子表面的一种重要的结构蛋白, 它决定病毒的细胞嗜性, 与宿主细胞受体结合, 在病毒与细胞膜融合并入侵细胞过程中起着重要的作用. S 蛋白有很好的免疫原性, 能诱导机体产生中和抗体, 在机体的抗病毒免疫中起重要作用. 研究表明 SARS 冠状病毒细胞受体为 ACE2^[6, 7]. 而位于 S 蛋白的 S1 部分第 318~510 氨基酸残基区域是 S 蛋白受体结合结构域(SRBD), 与细胞受体结合^[8-10]. 本研究克隆表达了 SRBD 片段, 结果表明原核表达产物可被抗 SARS 冠状病毒血清及单克隆抗体识别, 而且变性的 SRBD 融合蛋白免疫小鼠后能诱导产生 S 蛋白特异的抗体, 表明 SRBD 存在线性抗原表位, 可能在机体的免疫保护和病毒抗原的鉴定诊断中发挥作用. 为了进一步鉴定 SRBD 区的线性抗原表位, 设计表达了一组总数为 23 个部分重叠且覆盖该区域的短肽融合蛋白. 用免疫鸡血清和单克隆抗体对短肽融合蛋白组进行扫描, 结果鉴定出了两个线性抗原表位, 分别为 SRBD3 (F₃₃₄PSVYAWERKKISNCV₃₄₉) 和表位 D3D1 (K₄₄₇LRPFERDI₄₅₅). 表位 D3D1 是在以前的实验中已进行了精确鉴定的线性表位^[11]. 表位 SRBD3 为 SRBD 区的一个新线性表位, 此表位融合蛋白能诱导小鼠产生 S 蛋白特异的抗体.

He 等^[12]报道 SARS-CoV S 蛋白受体结合结构域可以诱导产生有效的中和抗体, 是研制 SARS 亚单位疫苗的候选靶位点. 在 He 等的实验中, 是将 RBD 片段与人 IgG1 的 Fc 片段融合, 在真核细胞中进行表达, 融合蛋白纯化后免疫家兔能诱导产生高滴度的病毒中和抗体. 在其他的实验中我们也检

测了鼠抗融合蛋白 GST-SRBD 和 GST-SRBD3 血清对包装有 SARS-CoV S 蛋白的伪型病毒的中和效果. 其中抗 GST-SRBD 血清有较弱的中和作用. 抗 GST-SRBD3 血清则没有观察到中和效果. 以上结果说明 RBD 区的中和表位以构象表位为主. 但也不能排除线性中和表位的存在, 因为没有观察到抗 GST-SRBD3 血清的中和效果可能与抗体效价不高有关, 也可能 GST 不是一个合适的融合载体. 因为中和表位诱导免疫动物产生中和抗体的能力受载体蛋白特性和免疫原的特定构象的影响^[13-15]. 有一个例子如鼠肝炎病毒 MHV S 蛋白的中和表位 A^[16-18], 当它用 pET 3x 表达系统表达^[13]或与 BSA 偶联^[14]免疫动物时不能诱导产生表位特异性抗体. 但是当它与一种昆虫血蓝蛋白偶联时则具有良好的免疫原性并且能诱导产生中和抗体^[14]. 当 MHV S 蛋白表位 A 与烟草花叶病毒重组, 或连接有流感病毒的 T 细胞表位, 或展示在噬菌体的表面时能对免疫鼠提供致死性保护^[15, 19, 20]. 所以要进一步了解表位 SRBD3 的免疫特性, 进行各种其他的尝试是有必要的.

参 考 文 献

- 1 Peiris J S, Lai S T, Poon L L, *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, **361** (9366): 1319~1325
- 2 Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348** (20): 1967~1976
- 3 Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348** (20): 1953~1966
- 4 Gallagher T M, Buchmeier M J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, **279** (2): 371~374
- 5 Hofmann H, Pohlmann S. Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol*, 2004, **12** (10): 466~472

- 6 Li W, Moore M J, Vasilieva N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, **426** (6965): 450–454
- 7 Wang P, Chen J, Zheng A, *et al.* Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315** (2): 439–444
- 8 Babcock G J, Eshaki D J, Thomas W D Jr, *et al.* Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol*, 2004, **78** (9): 4552–4560
- 9 Wong S K, Li W, Moore M J, *et al.* A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*, 2004, **279** (5): 3197–3201
- 10 Xiao X, Chakraborti S, Dimitrov A S, *et al.* The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312** (4): 1159–1164
- 11 Hua R, Zhou Y, Wang Y, *et al.* Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **319** (3): 929–935
- 12 He Y, Zhou Y, Liu S, *et al.* Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **324** (2): 773–781
- 13 Daniel C, Anderson R, Buchmeier M J, *et al.* Identification of an immunodominant linear neutralization domain on the S2 portion of the murine coronavirus spike glycoprotein and evidence that it forms part of complex tridimensional structure. *J Virol*, 1993, **67** (3): 1185–1194
- 14 Daniel C, Lacroix M, Talbot P J. Mapping of linear antigenic sites on the S glycoprotein of a neurotropic murine coronavirus with synthetic peptides: a combination of nine prediction algorithms fails to identify relevant epitopes and peptide immunogenicity is drastically influenced by the nature of the protein carrier. *Virology*, 1994, **202** (2): 540–549
- 15 Koolen M J, Borst M A, Horzinek M C, *et al.* Immunogenic peptide comprising a mouse hepatitis virus A59 B-cell epitope and an influenza virus T-cell epitope protects against lethal infection. *J Virol*, 1990, **64** (12): 6270–6273
- 16 Luytjes W, Geerts D, Posthumus W, *et al.* Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J Virol*, 1989, **63** (3): 1408–1412
- 17 Talbot P J, Buchmeier M J. Antigenic variation among murine coronaviruses: evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein, E2. *Virus Res*, 1985, **2** (4): 317–328
- 18 Talbot P J, Salmi A A, Knobler R L, *et al.* Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology*, 1984, **132** (2): 250–260
- 19 Koo M, Bendahmane M, Lettieri G A, *et al.* Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (14): 7774–7779
- 20 Yu M W, Scott J K, Fournier A, *et al.* Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides. *Virology*, 2000, **271** (1): 182–196

Expression and Antigenic Epitopes Mapping of Receptor Binding Domain on The Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

HUA Rong-Hong, TONG Guang-Zhi**, WANG Yun-Feng, ZHOU Yan-Jun

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerged human infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). The spike (S) protein of SARS-CoV is a major virion structural protein. It plays an important role in the interaction with receptors and neutralizing antibodies. Previously study demonstrated that amino acids 318 to 510 is the receptor binding domain of SARS-CoV spike protein. The receptor-binding domain of the spike protein was expressed by fusion with GST in a pGEX-6p-1 vector. Western blot results demonstrated that this fragment could be recognized by SARS convalescent sera and spike protein specific monoclonal antibody. To map the antigenic epitope of this region, a set of 23 partially overlapping fragments spanning the fragment were fused with GST and expressed. Then Western blot and ELISA reactivity of these short peptide fused protein to immunized sera and monoclonal antibody D3D1 were surveyed. Two linear antigenic epitopes SRBD3 (334~349) and D3D1 (447~455) were identified. Identification of antigenic epitopes of the spike protein of SARS-CoV may provide the basis for the development of immunity-based prophylactic, therapeutic, and diagnostic clinical techniques for severe acute respiratory syndrome.

Key words severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV), spike protein, epitope

*This work was supported by a Heilongjiang postdoctoral grant (HPD2003045).

**Corresponding author. Tel/Fax: 86-451-82734181, E-mail: gztong@hvri.ac.cn

Received: April 18, 2005 Accepted: May 31, 2005