

DOI:10.13350/j.cjpb.221001

• 论著 •

# 新型冠状病毒 M 蛋白表达及多克隆抗体制备\*

高岩<sup>1</sup>, 郑皖烽<sup>2</sup>, 宋桃花<sup>1</sup>, 徐海山<sup>1</sup>, 杜昆朋<sup>1</sup>, 郝明宇<sup>1</sup>, 付玉荣<sup>2</sup>, 伊正君<sup>1\*</sup>

(1. 潍坊医学院医学检验学院, 山东潍坊 261053; 2. 潍坊医学院基础医学院)

**【摘要】** 目的 利用原核表达系统表达新型冠状病毒 M 蛋白, 纯化后免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 并与 M 真核质粒免疫效果相比较, 为新型冠状病毒感染检测试剂盒的研制奠定基础。方法 将酶切鉴定正确的原核重组表达载体 PMAT-9s-M 转化 BL21, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达 M 蛋白并进行鉴定。M 蛋白经镍离子亲和层析柱纯化浓缩后免疫大白兔, 制备多克隆抗体。将 M 真核重组质粒转化至 DH5α, 碱裂解法大量抽提质粒后免疫大白兔, 制备多克隆抗体。采用 ELISA 检测 2 种抗血清的抗体效价, 采用 Western blot 检测 2 种抗血清与 M 蛋白的反应性。结果 PMAT-9s-M 转化 BL21 后表达 70 ku 的 His-MBP-M 融合蛋白, 且该蛋白主要存在于包涵体中。纯化后免疫大白兔, 制备的多克隆抗体血清效价与真核重组质粒免疫制备的抗血清抗体效价均达 1 : 16000, 且 2 种抗血清均与凝血酶切 M 蛋白有良好反应性。结论 原核表达的 M 蛋白免疫制备的多克隆抗体特异性强, 效价高, 且重组 M 蛋白制备简便、经济高效, 为新冠病毒感染诊断试剂盒的研制奠定了基础。

**【关键词】** 新型冠状病毒; M 基因; 多克隆抗体

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)10-1117-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.; 17(10):1117-1120.]

## Expression of novel coronavirus membrane protein and preparation of polyclonal antibody

GAO Yan<sup>1</sup>, ZHENG Wan-yi<sup>2</sup>, SONG Tao-hua<sup>1</sup>, XU Hai-shan<sup>1</sup>, DU Kun-peng<sup>1</sup>, HAO Ming-yu<sup>1</sup>, FU Yu-rong<sup>2</sup>, YI Zheng-jun<sup>1</sup> (1. School of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. School of Basic Medicine, Weifang Medical University)

**【Abstract】** **Objective** Novel coronavirus M protein was expressed in prokaryotic expression system, purified and immunized New Zealand rabbits, and the polyclonal antibody was prepared and compared with that of M eukaryotic plasmid, which laid the foundation for the development of novel coronavirus infection detection kit. **Methods** The correct prokaryotic recombinant expression vector PMAT-9s-M was transformed into BL21, and M protein was induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside and identified. M protein was purified and concentrated by nickel ion affinity chromatography and then immunized rabbits to prepare polyclonal antibodies. The M eukaryotic recombinant plasmid was transformed into DH5 α, and the plasmids were extracted by alkaline lysis, and the rabbits were immunized to prepare polyclonal antibodies. The antibody titers of the two antisera were detected by ELISA, and the reactivity of the two antisera with M protein was detected by Western blot. **Results** PMAT-9s-M was transformed into BL21 to express 70ku HIS-MBP-M fusion protein, which mainly existed in inclusion bodies. After purification, rabbit was immunized with polyclonal antibody and eukaryotic recombinant plasmid. The serum titers of polyclonal antibody and eukaryotic recombinant plasmid were both 1 : 16000, and both antisera had good reactivity with thrombin M protein. **Conclusion** The polyclonal antibody prepared by immunization of prokaryotic M protein has strong specificity and high titer, and the preparation of recombinant M protein is simple, economical and efficient, which lays a foundation for the development of novel coronavirus infection diagnosis kit.

**【Key words】** SARS-CoV-2; M gene; polyclonal antibody

\*\*\*自 2019 年起至今新型冠状病毒肺炎已在全球 200 多个国家地区暴发<sup>[1-2]</sup>。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于冠状病毒科乙型属, 在所有 RNA 病毒家族中拥有最大的基因组(26-32kD)。SARS-CoV-2 是单链正义的 RNA 病毒<sup>[3]</sup>, 编码 4 种结构蛋白(S、M、N、E), 16 种非结构蛋白(NSP1-NSP16)和 8 种辅助蛋白<sup>[4]</sup>。

目前针对新冠病毒结构蛋白的研究主要集中在 N 蛋白和 S 蛋白, 而 M 蛋白是病毒体中含量最多的蛋

白, 参与病毒的装配、侵袭、释放。M 蛋白是由 222 个氨基酸组成的糖基化结构蛋白, 在 N 端存在 3 个跨膜结构域, 其末尾的亲水区域暴露于病毒外表面与 S 蛋

\* **【基金项目】** 山东省自然科学基金重点项目 (No. ZR2018ZC1054)。

\*\* **【通讯作者】** 伊正君, E-mail: fuyizhengjun@163.com

**【作者简介】** 高岩 (1997-), 男, 山东潍坊人, 研究生。主要研究方向: 结核病治疗。E-mail: gy2602467196@163.com

白相结合, C端与N蛋白相结合主要维持病毒稳定<sup>[5-6]</sup>。本研究拟分别构建重组质粒 PMAT-9s-M 和 pcDNA3.1-M, 通过大肠埃希菌原核表达 M 蛋白免疫以及真核直接免疫获得相应的多克隆抗体, 通过 Western blot 及 ELISA 检测血清抗体效价和反应性, 为新型冠状病毒感染检测试剂盒<sup>[7]</sup>的研制奠定基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 细胞株、质粒及实验动物** 重组质粒 PMAT-9s-M、pcDNA3.1-M 购于上海海吉浩格生物科技有限公司; 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 为本实验室保存。新西兰大白兔由潍坊医学院实验动物中心提供。

**1.2 主要试剂** 限制性内切酶 BamH I, Xho I 及 Hind III 购于日本 Takara 公司; 质粒抽提试剂盒购于艾科瑞生物公司; LB 固体、液体培养基由本实验室配制; SDS-PAGE 凝胶试剂盒购于碧云天公司; 弗氏不完全佐剂, 凝血酶及 HRP 标记山羊抗兔抗体购于北京索莱宝科技有限公司; 抗 His 单克隆抗体及 HRP 标记山羊抗鼠抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 原核重组质粒的鉴定** 将 PMAT9s-M 重组质粒转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在氨苄抗性 LB 固体培养基上培养 12 h。挑取多个单菌落接种于氨苄抗性 LB 液体培养基中, 37 °C、160 r/min 振荡培养过夜, 利用质粒抽提试剂盒提取菌液中质粒并进行 BamH I、Hind III 双酶切鉴定, 阳性质粒菌液委托上海生工生物工程有限公司进行测序验证。

**2.2 真核重组质粒的鉴定及提取** 将 pcDNA3.1-M 重组质粒转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 按 2.1 的方法少量提取质粒进行 BamH I、Xho I 双酶切鉴定, 阳性菌液委托上海生工公司进行测序验证, 验证正确后采用碱裂解法大量提取质粒。

**2.3 His-MBP-M 融合蛋白的表达及鉴定** 将原核重组质粒 PMAT-9s-M 转化 BL21, 挑单菌落接种于 5 ml 氨苄抗性 LB 培养基中 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1 : 100 的比例将上述菌液接种于 100 ml 培养基 37 °C 振荡培养至 A<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 后加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷终浓度至 0.5 mmol/L 并继续培养 2 h。分别取诱导前及诱导 2 h 的菌液 (1.5 ml) 于离心管中, 以 10 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 10 min, 弃上清, 分别加入灭菌 PBS 缓冲液重悬, 按比例加入 5  $\times$  SDS 蛋白 loading buffer 充分混匀, 煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳并转膜, 以 His 标签抗体为一抗、HRP 标记的山羊抗鼠抗体为二抗进行 Western

blot, 验证 His-MBP-M 蛋白表达。

**2.4 His-MBP-M 融合蛋白可溶性分析及纯化** 取表达融合蛋白的重组菌接种于 200 ml 培养基 37 °C 振荡培养至 A<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷至终浓度为 0.1 mmol/L 继续培养 2 h 诱导蛋白表达。收集菌液, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 用 PBS 重悬沉淀, 用细胞破碎仪充分破碎菌体后于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 分别取上清和沉淀, 通过 SDS-PAGE 电泳对 M 蛋白进行可溶性分析。另取沉淀分别用包涵体洗液 I (0.5% 曲拉通, 10 mmol/L EDTA, 蒸馏水)、包涵体洗液 II (10% 曲拉通, 10 mmol/L EDTA, 蒸馏水) 和包涵体洗液 III (10 mmol/L EDTA, 蒸馏水, 2 mol/L 尿素) 洗涤, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀溶于 8 mol/L 尿素中 4 °C 静止 4 h, 然后装入透析袋透析, 透析过程中须逐步降低透析复性液中的尿素浓度 (4、3、2、1、0.5 mol/L)。采用 Ni-NTA 纯化 His-MBP-M 融合蛋白 (融合蛋白中含有组氨酸标签), 通过 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 采用 BCA 酶标仪检测蛋白浓度, 并与纯化前相比较。

**2.5 融合蛋白切割** 将融合蛋白和凝血酶在凝血酶缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH8.0) 37 °C 恒温箱中静止 6 h。分别取酶切前后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 分析 His-MBP-M 融合蛋白酶切效果。

**2.6 免疫动物与血清抗体的制备** 将新西兰大白兔分组 A、B 两组。A 组用纯化蛋白与弗氏不完全佐剂<sup>[8-9]</sup>按 1 : 1 的比例混合乳化后背部皮下多点注射兔, 首次注射剂量 1 mg/只, 其余为 0.5 mg/只, 每次免疫时间间隔为 10 d。B 组: 将真核重组质粒与生理盐水混合后于大白兔的双侧肱四头肌缓慢注射 0.5 ml/只 (含质粒 0.5 mg), 每次免疫间隔 10 d。共免疫 4 次, 免疫后对实验动物心脏采血并分离血清备用。

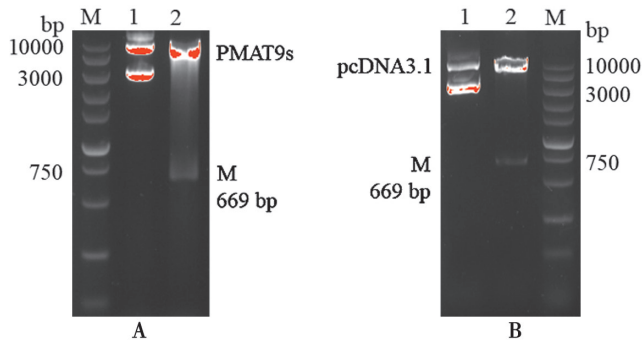
**2.7 抗体效价测定** 采用间接 ELISA 检测免疫大白兔子血清抗体效价。用酶切 M 蛋白包被 ELISA 板, 一抗分别为系列稀释的 A 组兔血清和 B 组兔血清, 阴性对照为未免疫兔血清, 二抗为 1 : 4000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG。用酶标仪测各孔的吸光度 (A<sub>450</sub>) 值并分析结果。

**2.8 多克隆抗体反应性检测** 用 Western blot 检测抗体的反应性, 将纯化和酶切 M 蛋白与 5  $\times$  SDS 蛋白上样缓冲液混合, 经 SDS-PAGE 电泳后转到 PVDF 膜上, 用 TBST 稀释脱脂奶粉配制封闭液封闭 2 h 后分别用 A 组 B 组免疫后兔血清和未免疫兔血清 (1 : 400) 作为一抗, 以 HRP 标记羊抗兔 IgG (1 : 6000) 作为二抗进行 Western blot, 曝光显色并记录结果。

## 结果

### 1 真核、原核重组质粒的鉴定

原核重组质粒和真核重组质粒双酶切验证如图1。原核重组质粒 PMAT-9s-M 经 BamH I、Hind III 双酶切后获得 669 bp 的基因片段和 5391 的载体 PMAT-9s 片段;真核重组质粒经 BamH I、Xho I 双酶切后获得 669 bp 的基因片段和 5 548 bp 载体 pcDNA3.1(+)-M 片段。



M DNA 标志物 1 原核重组质粒 PMAT9s-M 双酶切 2 真核重组质粒 pcDNA3.1(+)-M 双酶切

图1 原核重组质粒 PMAT9s-M(A)和真核重组质粒 pcDNA3.1(+)-M(B)的双酶切鉴定

M DNA marker 1 Prokaryotic recombinant plasmid PMAT9s-M 2 Eukaryotic recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-M

Fig.1 Double enzyme digestion identification of prokaryotic recombinant plasmid pMAT9S-M (A) and eukaryotic recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-M (B)

### 2 融合蛋白的表达与鉴定

原核重组质粒 PMAT-9s-M 转化 BL21 感受态细胞后,分别以 0.5 mmol/L IPTG 和不加 IPTG 诱导 2 h,各取 1 ml 菌液,处理后进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 2A,表达的融合蛋白分子质量为 70 ku;以抗 His 标签单克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠抗体为二抗进行 Western bolt,结果如图 2B,70 ku 处出现反应条带,证明表达产物为 His-MBP-M 蛋白。

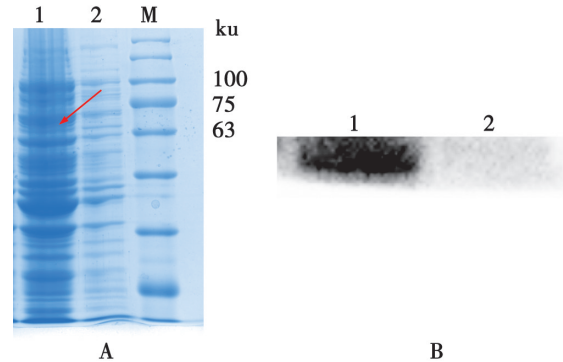
### 3 融合蛋白表达的可溶性分析、纯化及凝血酶切割

原核重组质粒 PMAT-9s-M 转化 BL21 感受态细胞后,分别以 0.5 mmol/L 加 IPTG 诱导分别诱导 4 h、6 h,取上清和沉淀,沉淀经离心、破碎后进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 3A,蛋白表达形式为包涵体。包涵体复性后上样镍离子亲和层析柱,用 5 mmol/L 咪唑洗掉杂蛋白,用 500 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白,SDS-PAGE 电泳显示为单一 70 ku 条带(图 3B);将凝血酶与蛋白按照 1 : 1000 的比例加入凝血酶缓冲液中 37 °C 切割 6 h,SDS-PAGE 电泳显示 25ku 处有明显的目的条带,凝血酶切割成功(图 3C)。

### 4 M 蛋白多克隆抗体的反应性

采用 Western blot 检测原核表达的 M 蛋白免疫

及真核重组质粒免疫制备的兔多克隆抗体与酶切蛋白的反应性,结果如图 4。原核表达的 M 蛋白免疫及真核重组质粒免疫制备的多克隆抗体均与酶切蛋白反应良好,未免疫兔血清不与酶切蛋白反应。

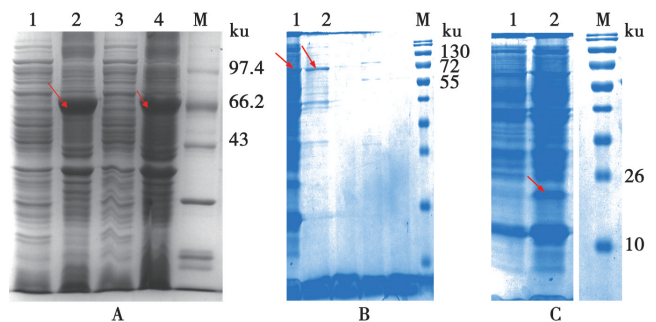


A SDS-PAGE 分析 His-M 在大肠埃希菌中的表达 M 蛋白分子质量标准 1 PMAT9s-M 转化 BL21IPTG 诱导表达产物 2 PMAT9s-M 转化 BL21 未诱导对照 B Western blot 分析 His-M 在大肠埃希菌中的表达 1 重组菌 IPTG 诱导表达产物与相应抗体反应条带 2 重组菌未诱导对照。

图2 融合蛋白 M 的原核表达验证

A The expression of His-M in Escherichia coli was analyzed M Protein relative molecular weight 1 PMAT9s-M after the induction 2 PMAT9s-M before the induction B Western blot The expression of His-M in Escherichia coli was analyzed 1 IPTG induced expression of the product and corresponding antibody reaction band 2 No control was induced by recombinant bacteria

Fig.2 Verification of prokaryotic expression of fusion protein M



A SDS-PAGE 分析 His-MBP-M 蛋白的可溶性 M 蛋白分子质量标准 1,2 分别为 IPTG 诱导 4h 的重组菌破碎上清和沉淀 3,4 分别为 IPTG 诱导 6 h 的重组菌破碎上清和沉淀 B 纯化融合蛋白 M 的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量质量标准 1 未纯化的融合蛋白 M2 纯化的融合蛋白 M C 凝血酶切割融合蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 切割前 2 切割后

图3 融合蛋白的可溶性、纯度及凝血酶切割 SDS-PAGE 电泳分析

A His-MBP-M Protein solubility analysis M Protein relative molecular weight 1,2 Supernatant and precipitation were induced after 4h of thalli fragmentation 3,4 Supernatant and precipitation were induced after 6h of thalli fragmentation B Purification effect analysis of fusion protein M M Protein relative molecular weight 1 Purification before 2 Purification after C SDS-PAGE analysis of fusion protein cleaved by thrombin M Protein relative molecular weight 1 Before cutting 2 After cutting

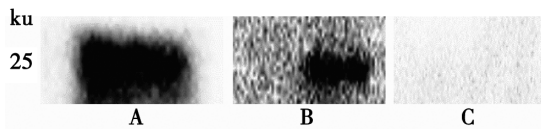
Fig.3 Purification of fusion proteins

### 5 免疫兔多克隆抗体效价

用适当稀释的酶切 M 蛋白包被酶标板进行 ELISA,检测原核表达 M 蛋白免疫及真核重组质粒免



疫制备的兔多克隆抗体血清效价,以未免疫血清作对照,结果如图5。原核表达 M 蛋白免疫及真核重组质粒免疫制备的兔多克隆抗体血清效价均达 1 : 16000。



A 原核表达 M 蛋白多克隆抗体与酶切 M 蛋白反应条带  
B 真核重组质粒免疫制备的多克隆抗体与酶切 M 蛋白反应条带  
C 未免疫血清对照

图4 Western blot 检测多克隆抗体的反应性

A The original nuclear serum B Eukaryotic serum C Unimmunized serum.

Fig. 4 Western blot analysis of the titer of polyclonal antibodies

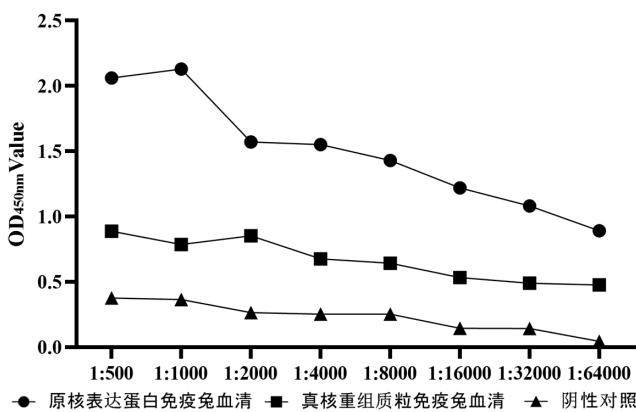


图5 ELISA 检测免疫兔血清抗体效价

Fig. 5 Rabbit antibody titer detection by ELISA

## 讨论

SARS-CoV-2 就感染人数和流行区域空间而言已经超过 SARS 和 MERS, 严重威胁全球公共卫生安全<sup>[10-11]</sup>。随着大量无症状感染者的出现进一步加大了追踪难度, 因此建立简便可靠的检测试剂盒对早发现新冠病例, 第一时间隔离可疑患者日益重要。针对 SARS-CoV-2 的疫苗主要包括亚单位蛋白疫苗、核酸疫苗、腺病毒载体疫苗、灭活疫苗和流感病毒载体疫苗。目前制备针对各种病毒的多克隆抗体免疫抗原主要包括基因免疫和病毒重组蛋白免疫两种。重组蛋白免疫可以避免病毒的散播危险, 基因免疫和重组蛋白免疫是否具有相同免疫原性、制备抗体是否可以达到实验要求需要进一步验证, 本研究分别采用了基因免疫和重组蛋白免疫的方法免疫新西兰大白兔<sup>[12]</sup>, 比较了两种免疫方法的免疫效果。

冠状病毒中含量最丰富的是结构蛋白 M, 存在的双层跨膜向内可以稳定 N 蛋白, 向外可以协同 S 蛋白, 与病毒其他成分可以相互作用, 含量丰富稳定可以作为新冠诊断试纸条的理想靶标。M 蛋白可以靶向信号通路, 影响 I、III 型干扰素产生, 减弱抗病毒免疫

力, 增强病毒复制。因此本研究选择 SARS-CoV-2 结构蛋白之一的 M 蛋白作为免疫抗原<sup>[13-14]</sup>。

本研究通过原核表达系统表达 His-MBP-M 蛋白, 纯化、浓缩后免疫新西兰大白兔, 并与 M 真核质粒免疫作比较, 制备的抗血清经 ELISA 测定效价均达到 1 : 16000, 且与 M 蛋白的反应性良好, 为新冠病毒感染快速检测试剂盒的研制奠定了基础。

## 【参考文献】

- [1] Wang MY, Zhao R, Gao LJ, et al. SARS-CoV-2: Structure, biology, and structure-based therapeutics development[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10):587269.
- [2] 陈爱平, 凌华, 叶盛, 等. SARS-CoV-2 基因组流行病学研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(10):775-779.
- [3] Zheng Y, Zhuang MW, Han L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1):299.
- [4] Zhang L, Jackson CB, Mou H, et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):6013.
- [5] Lu S, Ye Q, Singh D, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):502.
- [6] Fu YZ, Wang SY, Zheng ZQ, et al. SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(3):613-620.
- [7] 赵仁生, 周翔, 崔艺璇, 等. 新型冠状病毒膜蛋白的生物信息学分析[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 30(1):22-28, 68.
- [8] 刘雨晴, 尹宝靓, 姚毅波, 等. 不完全弗氏佐剂诱导的髓样细胞抑制 T 细胞活性[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(3):344-346.
- [9] 周雪飞, 钱晓萍, 刘宝瑞, 等. 弗式不完全佐剂诱导小鼠腹腔淋巴瘤模型方法的改进[J]. 江苏医药, 2011, 37(8):873-875.
- [10] Gulyaeva AA, Gorbalenya AE. A nidovirus perspective on SARS-CoV-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 538:24-34.
- [11] 张金铭, 项晓刚, 胡伟国, 等. 人类高致病性冠状病毒起源和进化的简述[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(10):672-676.
- [12] Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2[J]. Nature, 2021, 589(7840):125-130.
- [13] Thomas S. The structure of the membrane protein of SARS-CoV-2 resembles the sugar transporter SemiSWEET [J]. Pathog Immun, 2020, 5(1):342-363.
- [14] Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies[J]. Nature, 2020, 588(7839):682-687.

【收稿日期】 2022-04-26 【修回日期】 2022-06-16