

DOI:10.13350/j.cjpb.220105

• 论著 •

新型冠状病毒 3C 样蛋白酶的原核表达 及其多克隆抗体的制备*

郑皖烽¹, 李瑞芳¹, 徐海山², 宋桃花², 高岩², 陈柯¹, 伊正君², 付玉荣^{1**}

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

【摘要】 目的 表达及纯化新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 3C 样蛋白酶(3-chymotrypsin-like protease, 3CL^{pro})并制备 3CL^{pro} 多克隆抗体。方法 将重组质粒 pET28a-Proteinase_3CL-pro 转化大肠埃希菌 BL21(DE3), 利用 IPTG 诱导重组蛋白表达, 超声破碎后用 SDS-PAGE 凝胶分析蛋白表达情况, 利用 Ni-NTA 进行重组蛋白的纯化。用重组蛋白免疫 4~8 周龄健康小鼠, 制备多克隆抗体, 通过 Western blot 和 ELISA 对抗体进行定性和定量检测。结果 重组蛋白 His-3CL^{pro} 在重组菌培养上清中高表达, 分子质量单位为 33.8 ku。制备的多克隆抗体可特异结合重组蛋白 3CL^{pro}, ELISA 检测血清抗体效价可达 1:204 800。结论 在大肠埃希菌中成功表达 3CL^{pro}, 免疫小鼠并制备高效价的鼠抗 3CL^{pro} 多克隆抗体, 为研究 3CL^{pro} 功能进而开发新型冠状病毒检测试剂盒及治疗药物奠定了基础。

【关键词】 新型冠状病毒(SARS-CoV-2); 3C 样蛋白酶(3CL^{pro}); 原核表达; 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)01-0018-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):18-21.]

Prokaryotic expression of novel coronavirus 3C-like protease and preparation of polyclonal antibodies against it

ZHENG Wan-yi¹, LI Rui-fang¹, XU Hai-shan², SONG Tao-hua², GAO Yan², CHEN Ke¹, YI Zheng-jun², FU Yu-rong¹ (1. School of Basic Medicine of Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China; 2. School of Medical Laboratory of Weifang Medical University)

【Abstract】 **Objective** The expression and purification of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 3-chymotrypsin-like protease (3CL^{pro}) and the preparation of 3CL^{pro} polyclonal antibodies. **Methods** Transformation of recombinant plasmid pET28a-Proteinase_3CL-pro into *Escherichia coli* BL21(DE3), IPTG was used to induce the recombinant protein expression, SDS-PAGE was used to analyze the protein expression after ultrasonic crushing. The purification of the recombinant protein was made using Ni-NTA. The purified protein immune 4 ~ 8 weeks of healthy mice to prepare polyclonal antibodies. Qualitative and quantitative detection through Western blot and ELISA. **Results** The recombinant protein His-3CL^{pro} was highly expressed in the supernatant of recombinant bacteria, the molecular mass unit is 33.8ku. The preparation of polyclonal antibodies can be a specific combination of recombinant protein 3CL^{pro}; The antibody titer of serum polyclonal antibody was up to 1:204800. **Conclusion** 3CL^{pro} was successfully expressed in *E. coli*, mice were immunized and polyclonal antibodies against 3CL^{pro} were prepared, this has laid a foundation for studying the function of 3CL^{pro} and developing novel Coronavirus detection kits and therapeutic drugs.

【Key words】 SARS-CoV-2; 3CL^{pro}; prokaryotic expression; polyclonal antibody

*** 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)为一种新发现的冠状病毒,属于冠状病毒β属,与2003年流行的SARS冠状病毒(SARS-CoV)同源性约为80%^[1]。SARS-CoV-2可引起新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19),其主要症状为咳嗽、发热和呼吸困难等^[2]。SARS-CoV-2传播迅速,当前国内外诊治形势异常严峻。

SARS-CoV-2的遗传物质是单股正链RNA,其第一个可读框(open reading frame 1a/b, ORF 1a/b)编码16个非结构蛋白(nonstructural protein, NSP),3C

样蛋白酶(3-chymotrypsin-like protease, 3CL^{pro})是其中最具特征的药物靶标^[3-4]。病毒可以合成pp1a和pp1ab复制酶多肽,3C样蛋白酶(3CL^{pro})和木瓜蛋白

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

** **【通讯作者】** 付玉荣, E-mail: yifuyurong@163.com

【作者简介】 郑皖烽(1996-),女,吉林通化人,硕士研究生,主要研究方向为病原生物学;李瑞芳同为本文第一作者。E-mail: langzhengwanyi@163.com

酶样蛋白酶(papain-like protease, PL^{pro})可以将这两条多肽剪切成非结构蛋白,生成的非结构蛋白参与RNA的复制与转录,转录成功产生成熟的子代病毒感染更多细胞^[5-7]。3CL^{pro}在病毒的复制与宿主的感染过程中发挥重要作用,抑制3CL^{pro}功能能阻断SARS-CoV-2在宿主体内的复制,因此3CL^{pro}可作为研发疫苗的重要靶标以及开发抗病毒药物的重要靶点。本研究拟原核表达重组蛋白3CL^{pro},并免疫小鼠,制备高亲和力的3CL^{pro}多克隆抗体,为开发新型冠状病毒检测试剂盒及治疗药物提供靶点。

材料与方 法

1 材 料

1.1 实验动物 4~8周龄SPF级雌性BALB/c小鼠5只,购自潍坊医学院实验动物中心。

1.2 菌株、质粒及主要试剂 重组质粒pET28a-Proteinase_3CL-pro购于上海海吉浩格生物科技有限公司;大肠埃希菌DH5 α 、BL21(DE3)、LB培养基为本实验室保存及配制;限制性内切酶Nde I和Xho I购于日本Takara公司;质粒小量提取试剂盒购于艾科瑞生物;SDS-PAGE凝胶快速配置试剂盒购于碧云天生物;鼠源抗His单克隆抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;HRP标记的兔抗鼠IgG购于美国BBI生命科学有限公司;卡那霉素购于北京东胜泰博科技有限公司。

2 方 法

2.1 重组3CL^{pro}原核表达质粒的构建及鉴定 将重组质粒pET28a-Proteinase_3CL-pro转入DH5 α 感受态细胞,在LB固体培养基上37℃过夜培养,取单个菌落于卡那霉素抗性的LB液体培养基中继续培养至菌液A₄₅₀值约为1.2时,利用质粒抽提试剂盒对菌液提取质粒。用Nde I和Xho I两种限制性内切酶酶切鉴定,并由公司进行测序验证。

2.2 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒pET28a-Proteinase_3CL-pro转化至BL21感受态细胞,挑取单个阳性菌落于37℃、180 r/min培养增菌至A₄₅₀值为0.6~1.0时,加入不同浓度的IPTG诱导2-8 h菌液进行SDS-PAGE,分析重组蛋白的表达,确定蛋白的最佳诱导表达条件。

2.3 重组蛋白的纯化与鉴定 收集菌体,用预冷的Soluble Binding Buffer(5 mmol/L咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)重悬菌体,经超声裂解后离心留取上清。使用Buffer A平衡纯化柱至紫外吸收值及电导值平稳,将处理后样品上样并收集流出液,使用Buffer A平衡纯化柱至紫外吸收值及电导值平稳。依次使用5%、10%、20%、40%、60%、

100%的Buffer B洗脱目的蛋白,采用SDS-PAGE凝胶电泳分析洗脱目的蛋白的纯化效果,对鉴定合格的目的蛋白进行透析,将缓冲液置换为PBS,BCA试剂盒检测蛋白浓度。

将重组蛋白与loading buffer混匀,煮沸后进行SDS-PAGE电泳,转膜(90 v,55 min)后用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h;加入一抗(鼠源抗His标签抗体;1:12 000)4℃孵育过夜,洗膜3次,每次10 min;加入二抗(HRP标记的兔抗鼠IgG;1:6000),室温孵育60 min,洗膜3次,每次10 min;滴加ECL发光液,曝光。

2.4 多克隆抗体的制备 选取4只4~8周龄BALB/c小鼠饲养1周,取血眼球作为未免疫的阴性血清。取弗氏佐剂与重组蛋白等体积混匀并充分乳化后,采取颈背部多点皮下注射的方式免疫,第1次免疫后间隔2周进行加强免疫,加强免疫共3次,每次间隔1周,首次免疫剂量100 μ g/次/只,其余每次50 μ g/次/只。首次免疫佐剂为弗氏完全佐剂,加强免疫为弗氏不完全佐剂^[8]。第4次免疫后取血眼球,分离血清保存备用。

2.5 多克隆抗体血清的鉴定

2.5.1 间接ELISA法检测抗体效价 将纯化的重组蛋白用包被液稀释至20 μ g/ μ L,包被于96孔酶标板,4℃孵育过夜,洗涤5次;2% BSA 37℃封闭2.5 h,洗涤5次;分别加入梯度稀释的未免疫血清和阳性血清,37℃孵育1 h,洗涤5次;加入二抗(HRP标记兔抗鼠IgG),37℃孵育1 h,洗涤5次;加入底物显色液显色,观察液体颜色变化及时加入终止液终止反应;测量A₄₅₀值,以P/N(阳性孔A₄₅₀值/阴性孔A₄₅₀值) \geq 2.1为阳性,免疫血清阳性的最大稀释度为抗体效价^[9]。

2.5.2 Western blot 鉴定多克隆抗体的特异性 取纯化的重组蛋白进行SDS-PAGE,按上述方法转膜、封闭后,分别以未免疫血清和阳性血清作为一抗,以HRP标记的兔抗鼠IgG抗体为二抗进行Western blot 鉴定多克隆抗体的特异性。

结 果

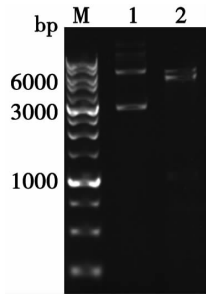
1 重组质粒的双酶切鉴定

重组质粒pET28a-Proteinase_3CL^{pro}用Nde I和Xho I酶切后进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图1),获得片段分别为1 004 bp和5 232 bp,与预期大小相符。

2 重组蛋白的诱导表达

重组质粒转化BL21后经IPTG诱导表达重组蛋白的分子质量单位为33.8 ku,与预期结果相符(图2A)。确定重组蛋白的最佳诱导条件为0.3 mmol/L IPTG,30℃诱导4 h,分别取重组菌超声破碎上清和

沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶分析,结果如图 2B,重组蛋白在上清与沉淀中均表达,且主要存在于上清中。

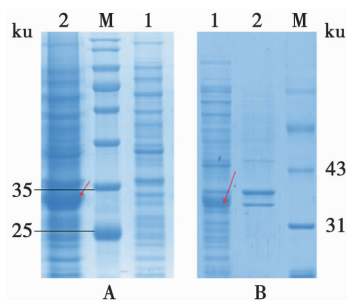


M DNA 标志物(DL10000) 1 重组质粒酶切前 2 重组质粒 Nde I 和 Xho I 双酶切

图 1 重组质粒 pET28a-Proteinase_3CL^{Pro} 的双酶切鉴定

M DL 10000 DNA marker 1 Before cutting recombinant plasmid enzyme 2 Recombinant plasmid Nde I and Xho I double digestion

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET28a-Proteinase_3CL^{Pro} by double digestion



A 重组蛋白 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 未诱导重组菌裂解全菌液 2 IPTG 诱导重组菌全菌裂解 B 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导重组菌裂解上清 2 IPTG 诱导重组菌裂解沉淀

图 2 重组蛋白 His-3CL^{Pro} 的诱导表达

A SDS-PAGE analysis of recombinant protein M Protein molecular mass standard 1 Uninduced recombinant bacteria 2 Induced recombinant bacteria B SDS-PAGE analysis of recombinant protein M Protein molecular mass standard 1 Induce lysis supernatant of recombinant bacteria 2 Induce precipitation of recombinant bacteria

Fig. 2 Induced expression of recombinant protein His-3CL^{Pro}

3 重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

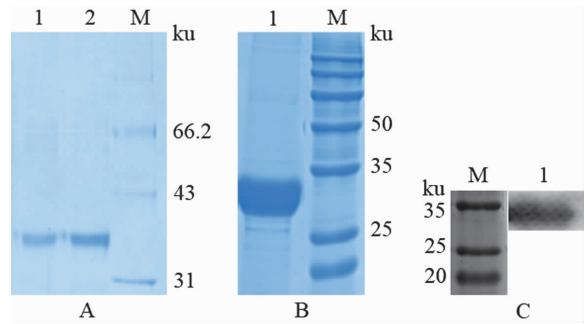
纯化的蛋白(图 3A)和超滤浓缩后的蛋白(图 3B)经 SDS-PAGE 电泳,均在 33.8 ku 处有单一条带,符合纯度要求。纯化的重组蛋白用 His 标签抗体进行 Western blot 鉴定,该蛋白能被相应抗体识别,即具有反应原性(图 3C)。

4 间接 ELISA 测定 3CL^{Pro} 免疫鼠血清抗体效价

ELISA 检测 3CL^{Pro} 免疫鼠血清抗体效价为 1 : 204 800(图 4)。

5 Western blot 检测多克隆抗体的特异性

Western blot 结果显示,3CL^{Pro} 免疫小鼠血清能与 3CL^{Pro} 发生反应,反应条带位于 33.8 ku 处。未免疫小鼠血清无此反应条带(图 5)。



A 纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1,2 纯化后的重组蛋白 B 超滤后的重组蛋白 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 超滤后的重组蛋白 C 重组蛋白 Western blot 鉴定 M 蛋白分子质量标准 1 重组蛋白与相应抗体反应条带

图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定

A The purified recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE M Protein molecular mass standard 1,2 Purified recombinant protein B SDS-PAGE analysis of recombinant proteins after ultrafiltration M Protein molecular mass standard 1 Recombinant protein after ultrafiltration C Western blot identification of recombinant protein M Protein molecular mass standard 1 Recombinant protein and corresponding antibody reaction bands.

Fig. 3 The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blot

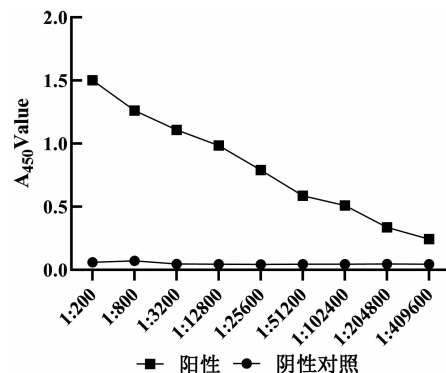
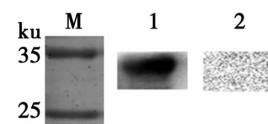


图 4 间接 ELISA 检测 3CL^{Pro} 免疫鼠血清抗体效价
Fig. 4 The titer of polyclonal antibodies was detected by indirect ELISA



M 蛋白分子质量标准 1 免疫鼠血清与相应抗体反应条带 2 阴性血清对照

图 5 重组蛋白的 Western blot 检测

M Protein molecular mass standard 1 The serum of immunized mice reacted with corresponding antibody bands 2 Negative control serum

Fig. 5 Western blot detection of recombinant protein

讨论

SARS-CoV-2 传播速度快,目前全球新冠肺炎疫情形势依然严峻,国内疫情局部暴发的风险依然存

