

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

SARS 冠状病毒 S 蛋白抗原表位分析与
定位研究

**Identification and Mapping of Antigenic Epitopes of Severe Acute
Respiratory Coronavirus Spike Protein**

博 士 研 究 生：华荣虹

指 导 教 师：童光志 研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：预防兽医学

研 究 方 向：动物病毒分子生物学

培 养 单 位：哈尔滨兽医研究所

提交日期 2005 年 6 月

A Ph. D. Dissertation

**Identification and Mapping of Antigenic
Epitopes of Severe Acute Respiratory
Coronavirus Spike Protein**

By

Hua Ronghong

Supervisor: Prof. Tong Guangzhi

Major: Preventive Veterinary Medicine

Research Field: Molecular Biology of Animal Viruses

**Graduate School of Chinese Academy of Agricultural
Sciences & Harbin Veterinary Research Institute**

Chinese Academy of Agricultural Sciences

China

June 2005

中国农业科学院研究生论文评审

论文评阅人: 吴东来 研究员
涂长春 研究员
刘文周 教 授

论文答辩委员会

主 席: 王君伟 教 授
专家组成员: 吴东来 研究员
相文华 研究员
步志高 研究员
李景鹏 教 授
李一经 教 授
刘胜旺 研究员

答 辩 日 期: 2005 年 6 月 16 日

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

中国 哈尔滨

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其它人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

严重急性呼吸综合征(Severe acute respiratory syndrome ,SARS)是由 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)引起的人类新发传染病 ,S、M、N、E 蛋白是 SARS-CoV 病毒粒子的几种主要结构蛋白。用 Lasergene 软件系统分析 SARS 病毒结构蛋白 S、M、N 蛋白,预测了 12 个抗原表位,用这些预测表位序列设计组合成四个嵌合基因 SSCV-A、SSCV-B、SSCV-C、SSCV-D。人工合成后插入 pGEX-6p-1 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点间,构建成融合表达质粒,转化宿主菌 BL21 经 IPTG 诱导后嵌合基因表达产物为可溶性蛋白。经免疫印迹试验表明嵌合基因表达产物可被 SARS 康复患者血清所识别,表明重组融合蛋白具有免疫反应性,提示预测表位中含有 SARS-CoV 结构蛋白的抗原表位。用纯化的重组融合蛋白 GST-SSCV-D 和 GST-SSCV-A 为抗原制备了一系列单克隆抗体。抗 SSCV-D 的单抗有两株,分别为 D3D1 和 D3C5。将 6 个 S 蛋白预测表位分别与 GST 融合表达。在这 6 个融合蛋白中,GST-S5 可以和单克隆抗体 D3C5 反应,GST-S2 可以和单抗 D3D1 反应。Western blot 分析表明两个单抗所识别的表位均为线性表位。两个表位分别位于 SARS-CoV 纤突蛋白的第 447 至 458 氨基酸残基和 789 至 799 氨基酸残基。D3D1 表位(447~458)正位于 S 蛋白与受体结合的结构域中。

2C5 是一株 SARS-CoV S 蛋白特异的有中和活性的单克隆抗体。以 2C5 为筛选靶分子,筛选噬菌体展示随机 7 肽库。经三轮淘洗后随机挑选 20 个噬菌体克隆进行 ELISA 分析和序列测定。在 10 个 ELISA OD 值大于 0.2 的阳性噬菌体克隆中,有 8 个噬菌体克隆展示有共同的 7 肽序列 TPEQQFT。展示有该序列的噬菌体克隆能竞争抑制 SARS-CoV S 蛋白抗原与单抗 2C5 的结合。与 SARS-CoV S 蛋白序列比对分析发现该 7 肽序列散布于 S 蛋白的第 539 位到第 559 位氨基酸上。将 S 蛋白 T₅₃₉PSSKRFQPFQFGRDVSDFT₅₅₉ 的 21 肽与 GST 进行融合表达,得到了可溶解的融合蛋白。该融合蛋白能不能被单抗 2C5 识别,但经 Western blot 分析表明该融合蛋白能被灭活 SARS 冠状病毒免疫鸡血清识别。表明 T₅₃₉PSSKRFQPFQFGRDVSDFT₅₅₉ 是 S 蛋白的一个线性表位,而 TPEQQFT 为单克隆抗体 2C5 的模拟表位。

SARS 冠状病毒 S 蛋白在病毒与宿主细胞受体结合、细胞膜融合及入侵、诱导机体产生中和抗体中起重要作用。S 蛋白受体结合结构域的核心区域为 318~510 片段。克隆并融合表达了 S 蛋白 318~510 片段,分析表明原核表达的受体结合结构域融合蛋白能被 SARS 康复患者清和高免动物血清所识别。进一步设计了一套 23 个覆盖整个该受体结合结构域的长为 16 氨基酸残基的部分重叠的短肽,并进行了融合表达。用 23 个融合蛋白对受体结合结构域进行抗原表位作图。结果鉴定出两个抗原表位 SRBD3 (F₃₃₄PSVYAWERKKISNCV₃₄₉) 和表位 D3D1 (K₄₄₇LRPFERDI₄₅₅)。

SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 部分在与细胞受体结合以及诱导机体产生保护性中和抗体中发挥重要作用。用 PCR 扩增 S1 (12~672) 及 S1N (12~510), S1C (318~672) 和 SRBD (318~510) 四个片段。PCR 产物分别克隆到表达载体 pGEX-6p-1 中,经诱导各融合蛋白均以包涵体形式表达。Western

blot 分析表明融合蛋白均能被单克隆抗体 D3D1 和鸡抗 SARS 冠状病毒血清识别。融合蛋白包涵体变性溶解后与鸡抗 SARS 冠状病毒血清 ELISA 分析结果也显示良好的免疫反应性。与鸡抗 SARS 冠状病毒血清的 ELISA 和 Western blot 结果均表明位于 S 蛋白 510~672 氨基酸残基片段是 S1 蛋白中的免疫优势决定区。为了对这一免疫优势区域进行进一步的抗原表位鉴定,设计了一套 16 个部分重叠的短肽,这些短肽覆盖全部 510~672 片段。每一个短肽合成一对寡核苷酸链,退火后插入表达载体 pGEX-6p-1,与 GST 进行融合表达。各表达融合蛋白均以可溶解的形式表达。表达的融合蛋白以谷胱甘肽亲和柱层析纯化。用免疫鸡血清对 16 个短肽融合蛋白进行 Western blot 和 ELISA 反应性扫描,鉴定出了四个抗原表位。分别为 S1C3(539~559),S1C4(548~567),S1C7/8(583~606)和 S1C10/11(607~630)。用这四个融合蛋白对小鼠进行免疫,结果表明这四个融合蛋白均能诱导小鼠产生 S 蛋白特异的抗体,且间接免疫荧光试验表明这些抗体均能识别真核表达的 S 蛋白的表面结构域。该结果可以为进一步进行基于抗原表位的 SARS 诊断、治疗试剂的研究提供理论基础。

本实验鉴定出了 7 个 S 蛋白线性抗原表位 SRBD3 ,D3C5 ,D3D1 ,S1C3 ,S1C4 ,S1C7/8 ,S1C10/11 ,和一个 S 蛋白模拟表位。对进一步分析 S 蛋白的结构与功能以及建立以表位为基础的抗原抗体诊断方法和基于表位的疫苗的设计研究具有重要的意义。

关键词：SARS 冠状病毒,纤突蛋白,单克隆抗体,表位,表位作图

Identification and Mapping of Antigenic Epitopes of Severe Acute Respiratory Coronavirus Spike Protein

Abstract

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerged human infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). And the S, M, N and E protein are four main structural proteins of 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. In the study, six epitopes (S1 S2 S3 S4 S5 S6) of the spike protein of SARS-CoV were predicted by bioinformatics analysis. Firstly, a multi-epitopes chimeric antigen gene was constructed and synthesized. The chimeric antigen gene then fused to downstream GST gene in pGEX-6p-1. The western blot assay demonstrated that SARS patient convalescent serum could recognize the recombinant fusion protein. And six predicted epitopes gene fused to GST expressed in *E.coli* BL21 respectively. Among six fusion proteins, GST-S5 reacted with monoclonal antibody D3C5 and GST-S2 reacted with monoclonal antibody D3D1 against spike protein of SARS-CoV. The results indicated that the epitopes recognized by monoclonal antibody D3C5 and D3D1 are all lineal epitopes. The two epitopes correspond the sequence of 447 to 458 and 789-799 amino acid of spike protein of SARS-CoV respectively.

2C5 is a SARS-CoV spike protein specific neutralizing monoclonal antibody. Based 2C5 as the target molecular, C7CTM phage display peptide library were screened. After the third panning 20 phage clones were analyzed and sequenced. Among these 20 clones, there are 7 get the same sequence TPEQQFT and their OD value in ELISA are all over 0.2. And the phages displayed this peptide could inhibit and compete with SARS-CoV spike protein in binding with monoclonal antibody 2C5. Align the peptide with spike protein sequence, we found it may located in amino acid 539 to 559 of spike protein. In further step S539-559 was fused with GST and expressed and purified. But the followed analysis demonstrated that 2C5 did not binding with S539-559. However, this fusion protein could be recognized by immunized chicken sera. So S539-559 is a lineal epitope of spike protein, but not the epitope of 2C5. And the sequence TPEQQFT is a mimic epitope of monoclonal antibody 2C5.

Amino acid 318 to 510 is the receptor binding domain of SARS-CoV spike protein. To map the antigenic epitope of this region, a set of 23 partially overlapping fragments spanning the fragment were fused with GST and expressed. With Western blot and ELISA analysis, two antigenic epitopes SRBD3 (334-349) and epitope D3D1 (447-455) were identified. Immunization of mice with each of the two antigenic epitope-fused proteins revealed that all four proteins could elicit spike protein specific antisera.

In this study, the S1 domain of the spike protein and three truncated fragments S1N, S1C and SRBD were expressed by fusion with GST in a pGEX-6p-1 vector. ELISA and Western blot results demonstrated that the 510-672 fragment of the S1 domain is the antigenic dominant region. To map the antigenic epitope of this antigenic dominant region, a set of 16 partially overlapping fragments spanning the fragment were fused with GST and expressed. Four antigenic epitopes S1C3 (539-559), S1C4 (548-567), S1C7/8 (583-606) and S1C10/11 (607-630) were identified. Immunization of mice with each of the four antigenic epitope-fused proteins revealed that all four proteins could elicit spike protein specific antisera. And all of them were able to bind to the surface domain of whole spike protein expressed by recombinant baculovirus in insect cells. 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.

All together, seven lineal antigenic epitopes SRBD3 ,D3C5 ,D3D1 ,S1C3 ,S1C4 ,S1C7/8 ,S1C10/11 and one mimic epitope were identified. This work could provide the basis for the development of immunity-based prophylactic, therapeutic, and diagnostic techniques for the control of severe acute respiratory syndrome and further structural and function analysis of spike protein.

Keywords: SARS-CoV, Spike protein, Monoclonal antibody, Epitope, Epitope mapping.

目 录

引言	1
1 SARS-CoV 的形态结构	1
2 SARS-CoV 的病原学与分类	2
3 SARS-CoV 的基因组研究进展	3
4 SARS-CoV 的受体	5
5 SARS-CoV 的包装信号	6
6 SARS-CoV 基因组编码蛋白	6
7 SARS-CoV S 蛋白抗原表位的研究进展	10
8 SARS-CoV N 蛋白抗原表位的研究进展	11
9 SARS 的免疫学及分子生物学诊断方法研究进展	11
10 SARS 防治研究进展	14
11 存在的问题与展望	16
12 本研究目的与意义	16
研究报告	17
实验一 SARS 冠状病毒结构蛋白表位预测及多表位嵌合基因的构建与表达	17
1 材料与方法	19
1.1 菌株与质粒	19
1.2 酶与标记物	19
1.3 抗 SARS-CoV 血清	19
1.4 结构蛋白抗原表位的预测	19
1.5 嵌合基因的设计与合成	19
1.6 pGEX-SSCV 融合表达载体的构建	20
1.7 重组质粒的原核表达与纯化	20
1.8 Western blot 检测融合蛋白与 SARS 康复病人血清的免疫反应性	20
2 结果	20
2.1 结构蛋白特性分析及表位预测	20
2.2 嵌合基因的设计	23
2.3 融合表达质粒的构建	25
2.4 GST-SSCV 融合蛋白的表达	25
2.5 GST-SSCV 融合蛋白的纯化	26
2.6 融合蛋白的免疫反应性	27
3 讨论	27

实验二 SARS 冠状病毒单克隆抗体的制备及表位鉴定	28
1 材料与方法	28
1.1 单克隆抗体的制备	28
1.2 表达 S 蛋白预测表位寡核苷酸链的设计	29
1.3 表达覆盖 S2 和 S5 的 9 氨基酸短肽系列的设计	29
1.4 预测表位及 9 肽的融合表达	29
1.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)	30
1.6 免疫印迹试验 (Western blot)	31
2 结果	31
2.1 预测表位及 9 肽融合蛋白的表达	31
2.2 重组多表位融合蛋白 GST - D 免疫印迹检测结果	31
2.3 预测表位融合蛋白 GST - S2 和 GST - S5 免疫印迹检测结果	31
2.4 单克隆抗体的制备与鉴定	32
2.5 单克隆抗体的表位鉴定	34
2.6 单克隆抗体表位的精确定位	34
3 讨论	37
实验三 SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体 2C5 识别表位的鉴定	39
1 材料与方法	39
1.1 噬菌体随机肽库、菌株和单克隆抗体	39
1.2 其它试剂与材料	40
1.3 主要试剂的配制	40
1.4 噬菌体的滴定	40
1.5 噬菌体肽库的亲筛选	41
1.6 筛选噬菌体的克隆和扩增	42
1.7 噬菌体序列的测定	43
1.8 噬菌体 ELISA	43
1.9 噬菌体竞争抑制 ELISA	43
1.10 多肽的融合表达与融合蛋白的纯化	43
1.11 融合蛋白与单克隆抗体 2C5 的 ELISA 分析	44
1.12 融合蛋白与鸡抗 SARS 冠状病毒血清的 Western blot 分析	44
2 结果	44
2.1 噬菌体肽库的筛选	44
2.2 噬菌体的克隆与结合分析	45
2.3 噬菌体展示序列的测定与分析	46
2.4 噬菌体的竞争 ELISA	47
2.5 短肽的融合表达与纯化	48
2.6 融合蛋白的免疫反应性	48
3 讨论	49

实验四 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 部分的表达与免疫分析.....	51
1 材料与方法.....	52
1.1 质粒、菌种及 SARS 基因.....	52
1.2 血清、抗体及试剂.....	52
1.3 S1、S1N、S1C 及 SRBD 基因片段的 PCR 扩增.....	52
1.4 S1、S1N、S1C 及 SRBD 片段表达质粒的构建.....	53
1.5 重组质粒的诱导表达.....	53
1.6 表达产物的 Western blot 分析.....	53
1.7 表达产物的 ELISA 分析.....	54
2 结果.....	54
2.1 PCR 扩增.....	54
2.2 重组质粒的构建与鉴定.....	54
2.3 重组质粒的诱导表达.....	54
2.4 表达产物的 Western blot 分析.....	57
2.5 表达产物的 ELISA 分析.....	57
3 讨论.....	58
实验五 SARS 冠状病毒 S1 蛋白主要抗原决定区的表位作图.....	60
1 材料与方法.....	61
1.1 质粒怀菌株.....	61
1.2 酶与标记物.....	61
1.3 抗 SARS-CoV 阳性血清及真核表达 S 蛋白抗原.....	61
1.4 短肽融合蛋白的设计.....	61
1.5 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化.....	64
1.6 鼠抗融合蛋白血清的制备.....	64
1.7 Western blot.....	64
1.8 ELISA.....	64
1.9 动物免疫.....	65
1.10 间接免疫荧光试验.....	65
2 结果.....	65
2.1 短肽融合蛋白的表达与纯化.....	65
2.2 抗原表位作图.....	66
2.3 抗原表位的免疫原性.....	69
2.4 抗表位单因子血清的特性.....	69
3 讨论.....	71
实验六 SARS 冠状病毒 S 蛋白受体结合结构域的表达及表位作图.....	72
1 材料和方法.....	72
1.1 质粒与菌株.....	72
1.2 酶与标记物.....	72

1.3 抗 SARS-CoV 阳性血清.....	73
1.4 pGEX-SRBD 融合表达载体的构建与表达.....	73
1.5 短肽融合蛋白的设计与表达纯化.....	73
1.6 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化.....	76
1.7 鼠抗融合蛋白 GST-SRBD 和 GST-SRBD3 血清的制备.....	76
1.8 Western blot.....	77
1.9 ELISA.....	77
2 结果.....	77
2.1 受体结合结构域的融合表达与免疫印迹分析.....	77
2.2 短肽融合蛋白的表达与纯化.....	79
2.3 短肽融合蛋白的 Western blot 分析与 ELSIA 分析.....	80
2.4 SRBD3 的免疫原性.....	81
2.5 受体结构区抗原表位作图结果.....	82
3 讨论.....	82
结论.....	84
参考文献.....	85
致谢.....	102
作者简介.....	103

插图和表格清单

图 1-1	SARS 冠状病毒结构模式图与病毒粒子电镜照片	1
图 1-2	SARS-CoV 的系统进化分析	4
图 1-3	SARS-CoV 基因组及亚基因组表达情况示意图	5
图 1-4	病毒与细胞膜融合与抑制示意图	8
图 2-1	SARS-CoV S 蛋白、M 蛋白、N 蛋白的抗原性、亲水性和表面可及性分析	22
图 2-2	重组嵌合蛋白的亲水性和抗原性以及表面可及性分析	24
图 2-3	重组质粒的酶切鉴定	25
图 2-4	重组质粒诱导表达的 SDS-PAGE 分析	25
图 2-5	纯化融合蛋白的 SDS-PAGE 分析	26
图 2-6	融合蛋白的 western-blot 分析	26
图 3-1	重组融合蛋白的免疫印迹分析	32
图 3-2	SARS-CoV ELISA 对 6 株单克隆抗体细胞株腹水特异性检测	33
图 3-3	单抗 D3D1 与灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 的 Western blot 分析	34
图 3-4	预测表位融合蛋白与单克隆抗体的 Western blot 分析结果	35
图 3-5	预测表位融合蛋白与单克隆抗体的 ELISA 检测结果	36
图 3-6	表位 S2 和 S5 精确定位的 Western blot 分析结果	37
图 3-7	表位鉴定结果示意图	38
图 4-1	噬菌体噬斑	45
图 4-2	噬菌体与单克隆抗体 2C5 的 ELISA 结合分析	45
图 4-3	噬菌体展示肽序列与 S 蛋白序列的比对分析	47
图 4-4	噬菌体的竞争抑制 ELISA	47
图 4-5	短肽融合蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析	48
图 4-6	融合蛋白与单克隆抗体 2C5 的 ELISA(A)和与免疫鸡血清的 Western blot (B)	49
图 5-1	四个基因片段的 PCR 扩增	55
图 5-2	重组质粒的酶切鉴定	55
图 5-3	表达产物的 SDS-PAGE 分析	56
图 5-4	重组融合蛋白的 Western blot 分析	57
图 5-5	重组融合蛋白的 ELISA 检测	57
图 5-6	重组融合蛋白与免疫鸡血清 Western blot 反应示意图	58
图 6-1	短肽融合蛋白组的设计表达与纯化	66
图 6-2	融合蛋白组的 ELISA 和 Western blot 扫描	67
图 6-3	表位融合蛋白与 SARS 康复患者血清的 ELISA 反应	68
图 6-4	表位融合蛋白的竞争抑制 ELISA	68
图 6-5	融合蛋白抗血清与 S 蛋白抗原的 ELISA 和 Western blot 反应性分析	69
图 6-6	表位单因子血清对表达 S 蛋白细胞的间接免疫荧光染色	70
图 7-1	GST-SRBD 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析	78
图 7-2	GST-SRBD Western blot 分析	78

图 7-3	表达 SRBD1 - SRBD23 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析.....	79
图 7-4	融合蛋白 GST-SRBD3 的纯化.....	80
图 7-5	短肽融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23 与免疫鸡血清的 Western blot 分析.....	80
图 7-6	短肽融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23 与单抗 D3D1 的 ELISA 分析.....	81
图 7-7	GST-SRBD3 抗血清与杆状病毒表达 S 蛋白反应性的 ELISA 分析.....	81
图 7-8	S 蛋白受体结合区表位作图结果示意图.....	82
表 1-1	动物冠状病毒的分类.....	3
表 2-1	结构蛋白表位预测.....	21
表 3-1	合成的寡核苷酸序列及编码的多肽序列.....	30
表 3-2	SARS-CoV 合成表位单克隆抗体亚型的鉴定.....	33
表 4-1	噬菌体肽库的筛选.....	44
表 4-2	噬菌体序列测定结果.....	46
表 5-1	PCR 引物序列.....	53
表 6-1	短肽序列与位置.....	62
表 6-2	编码短肽寡核苷酸序列表.....	63
表 7-1	覆盖受体结合结构域的部分重叠短肽的设计表.....	74
表 7-2	编码短肽寡核苷酸序列表.....	75

引言

2002 年 11 月 16 日, 第一例严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome , SARS) 病例在中国广东省佛山市出现。之后, SARS 迅速传播至其它国家和地区。至 2003 年 9 月 26 日, 全球累计 8098 人被感染, 死亡 774 人 (http://www.who.int/csr/sars/country/table2003_09_23/en/)。SARS 的出现与传播, 引起了中国国家卫生部和世界卫生组织 (WHO) 的关注。2003 年 3 月 12 日, WHO 发布了 SARS 的全球性警告。随后在 WHO 的组织协调下由中国、德国、美国等 10 个国家和地区的 13 个实验室组成一个 SARS 研究网络。3 月 23 日, 香港地区和美国几乎同时报告, 一种冠状病毒有可能是真正的元凶。4 月 12 日, 加拿大科学家绘制出了被怀疑是“非典”病原体的冠状病毒的基因图谱, 并进行了基因组破译研究 (Marra 等, 2003 ; Snijder 等, 2003)。世界卫生组织认为这是一个重大的研究突破。随后美国和中国以及其它国家和地区科学家也先后完成了数株病毒的全基因组测序工作 (Ksiazek 等, 2003 ; Qin ED 等, 2003 ; Rota 等, 2003)。在研究网络的协作努力下, 2003 年 4 月 16 日世界卫生组织正式宣布这种新型冠状病毒为 SARS 病源, 并将其命名为 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) (Peiris 等, 2003a ; Holmes 等, 2003 ; Ksiazek 等, 2003 ; Drosten 等, 2003)。

1 SARS-CoV 的形态结构

SARS-CoV 属于尼多病毒目 (Order: Nidovirales) 冠状病毒科 (Family: Coronaviridae) 冠状病毒属 (Genus: Coronavirus)。SARS-CoV 病毒粒子呈球形, 直径约为 80~140nm, 有囊膜, 与其它冠状病毒一样, 其囊膜表面有排列较宽, 形如日冕的纤突蛋白, S 蛋白形成的放射状结构厚约 20~40nm, 无血凝素酯酶糖蛋白 (Ksiazek 等, 2003), SARS 冠状病毒的模式图和电镜照片如图 1-1 所示。基因组为单链正义 RNA, 与核蛋白结合形成螺旋结构位于病毒粒子的中央。SARS-CoV 的形态结构与其它动物冠状病毒极为相似。

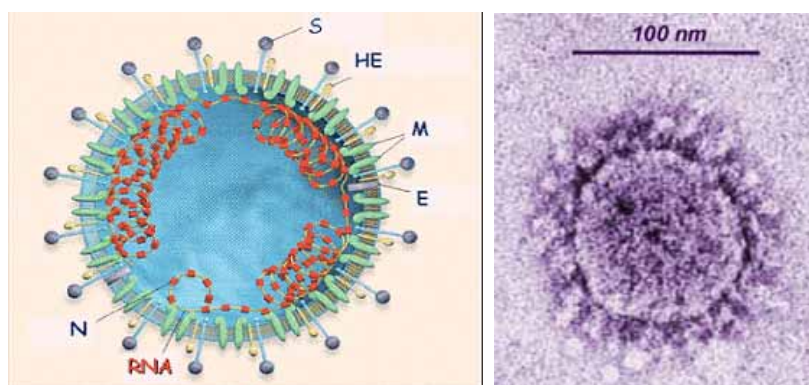


图 1-1. SARS 冠状病毒结构模式图与病毒粒子电镜照片

Fig.1-1 The model and Negative-stain electron microscopy picture of SARS-CoV.

2 SARS-CoV 的病原学与分类

冠状病毒最早于 1937 年从鸡中分离到,即为禽传染性支气管炎病毒(IVB)。至今该病毒科按血清型主要分为 3 组共有 18 个种 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>),除感染人外,还感染牛、猪、猫、狗、禽类和啮齿类动物。人冠状病毒 (Human Corona Virus) 是导致感冒的主要病原之一。1965 年 Tyrrell 和 Bynoe 等人用人胚气管培养首次分离了人冠状病毒 (HCoV)。也是首次确认了冠状病毒令人类出现感冒。随后,Hamre 等人用人胚肾细胞分离到类似病毒,代表株命名为 229E 病毒。1967 年,McIntosh 等人用人胚气管培养从感冒病人中分离到一批病毒,其代表株是 OC43 株。1968 年,Almeida 等对这些病毒进行了形态学研究,电子显微镜观察发现这些病毒的包膜上有形状类似日冕的棘突,故提出命名这类病毒为冠状病毒。1975 年病毒命名委员会正式命名了冠状病毒科。根据病毒的血清学特点和核苷酸序列的差异,目前冠状病毒分为冠状病毒和环曲病毒两个属。代表株为禽传染性支气管炎病毒 (Avian infectious bronchitis virus, IBV)。其它成员有:人冠状病毒 (Human coronavirus),鼠肝炎病毒(Murine virus hepatitis, MHV),猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus),猪传染性胃肠炎病毒 (Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV),初生犊腹泻冠状病毒 (Neonatal calf diarrhea coronavirus, BCV),大鼠冠状病毒 (Rat coronavirus, RCV),火鸡蓝冠病毒 (Turkey bluecomb virus),猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus),可能成员有:犬冠状病毒 (Canine coronavirus),大鼠涎腺腺炎病毒 (Sialodacryoadenitis virus of rat),人肠道冠状病毒 (Human enteric coronavirus)

在2003年非典型肺炎发生前,人类仅发现两种可传于人体的冠状病毒,但只会引发感冒。除此之外,其他冠状病毒,多数只存活在猪牛及鸡等畜禽及哺乳动物身上。SARS冠病毒是一种新的冠病毒,以前从未被医学界发现,它在进化树上是独立的分支,跟已知的鸟,牛,鼠等冠病毒在进化距离上相等。比对结果显示其基因组以及各结构蛋白跟已知的冠病毒都有较大的不同 (Ksiazek等, 2003; 张其鹏等, 2003; Rota等, 2003; Ruan等, 2003)。这种新病毒从何而来,已有的研究分析表明它不可能是一种人源病毒 (Marra等, 2003),也排除了人造病毒的可能 (Qin ED等, 2003),一般认为SARS冠状病毒极有可能来源于其它动物。香港科学家Guan等最先从广东野生动物市场内的果子狸中分离出了SARS冠状病毒样病毒 (Guan Y等, 2003)。而且实验表明SARS冠状病毒可以感染猫、老鼠、雪貂、猕猴 (macaques) 等野生动物 (Kuiken等, 2003; Subbarao等, 2004; Martina等, 2003)。所以在分类上, SARS冠状病毒不同于已知的三群动物冠状病毒中的任何一群,现列为每4群 (表1-1)。

表 1-1. 动物冠状病毒的分类

Table 1-1 Classification of coronavirus.

抗原群	病毒	宿主	致病性
1	HCoV-229E	Human	Respiratory infection
	TGEV	Pig	Enteritis
	PRCoV	Pig	Respiratory infection
	PEDV	Pig	Enteritis
	FIPV	Cat	Peritonitis,systemic infection
	FCoV	Cat	Enteritis
	CCoV	Dog	Enteritis
2	HCV-OC43	Human	Respiratory infection
	MHV	Mouse	Respiratory,enteritis,hepatitis,encephalitis
	RCoV	Rat	Respiratory infection
	HEV	Pig	Respiratory,encephalomyelitis
	BCoV	Cattle	Enteritis
3	IBV	Chicken	Respiratory infection
	ICoV	Turkey	Enteritis
4	SARS-CoV	Human	Pneumonia,diarrhea?

3 SARS-CoV 的基因组学研究进展

冠状病毒基因组为一不分节段的正义单链 RNA，长度约为 27~31kb，位于病毒颗粒中央，与核衣壳蛋白结合。基因组 5'端有甲基化帽子结构，3'端有 PolyA 尾结构，结构特征与其它正链 RNA 病毒相似。在成熟的冠状病毒粒子中不存在 RNA 病毒复制所需的 RNA 聚合酶，病毒进入细胞后以病毒基因组 RNA 为翻译模板，表达出病毒 RNA 聚合酶，进一步转录合成负链基因组 RNA 和各结构蛋白 mRNA 以及病毒基因组 RNA 的复制。冠状病毒各个结构蛋白成熟 mRNA 的合成,是通过 RNA 聚合酶和一些转录因子识别特定的转录调控序列 (transcription regulating sequences, TSR)，以一种不连续转录的机制选择性地从负义 RNA 链上转录合成的。

SARS 冠状病毒基因组大小约为 29.7kb，至 2003 年 9 月已有 35 条病毒基因组全序列发表。系统发生进化分析表明 SARS 冠状病毒不属于已知动物冠状病毒三个群中的任何一群，它是一个新的病毒群 (图 1-2) (Marra 等, 2003; Ksiazek 等, 2003; Rota 等, 2003; 张其鹏等, 2003)。通过对基因组全序列分析表明,在基因组的 5'端和 3'端分别存在 265 碱基和 342 碱基的非翻译区 (Marra 等, 2003; Rota 等, 2003)。预测基因组包含 14 个功能性的开放阅读框 (Thiel 等, 2003),

其基因组 5'端约三分之二的区域 ORF1a 和 ORF1b, 编码病毒 RNA 复制酶蛋白, 负责病毒基因组 RNA 的合成与复制; 后三分之一的区域包含 12 个开放阅读框, 主要编码病毒的四种结构蛋白, 按基因组上的排列顺序依次为 S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白、N 蛋白, 和其它功能现在还不清楚的蛋白 (图 1-3); 未发现 HE 蛋白编码序列。SARS 冠状病毒基因组属于典型的缺乏 HE 蛋白的冠状病毒基因组结构。基于对已发表各毒株的基因组结构分析均指出在结构蛋白编码区可能的开放阅读框中, 存在已有蛋白质序列数据库中未找到任何同源序列的未知蛋白。在对冠状病毒基因组的 5'端非翻译区和各个 ORF 起始密码子上游的区域分析发现, 在 ORF1a、S 蛋白、X1 (即 Tor2ORF3)、M 蛋白、X4 (即 Tor2ORF8)、X5 (即 Tor2ORF9) 和 N 蛋白上游存在一个类似于其他冠状病毒参与不连续转录识别的特征性转录调控序列 (TRS) -AAACGAAC (Marra 等, 2003; Qin ED 等, 2003; Rota 等, 2003)。

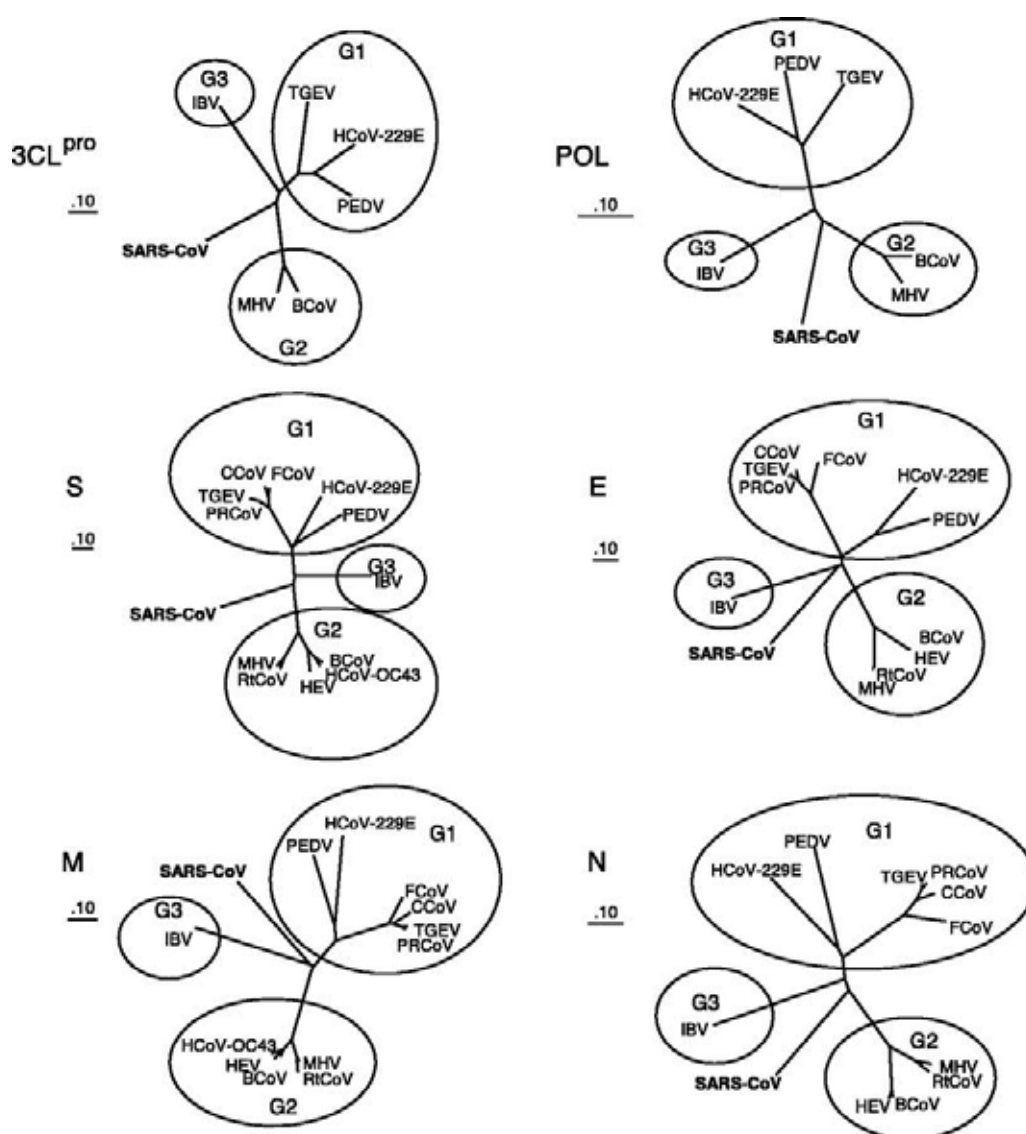


图 1-2 SARS-CoV 的系统进化分析 (Rota et al. 2003)

Fig.1-2 Phylogeny analysis of coronavirus.

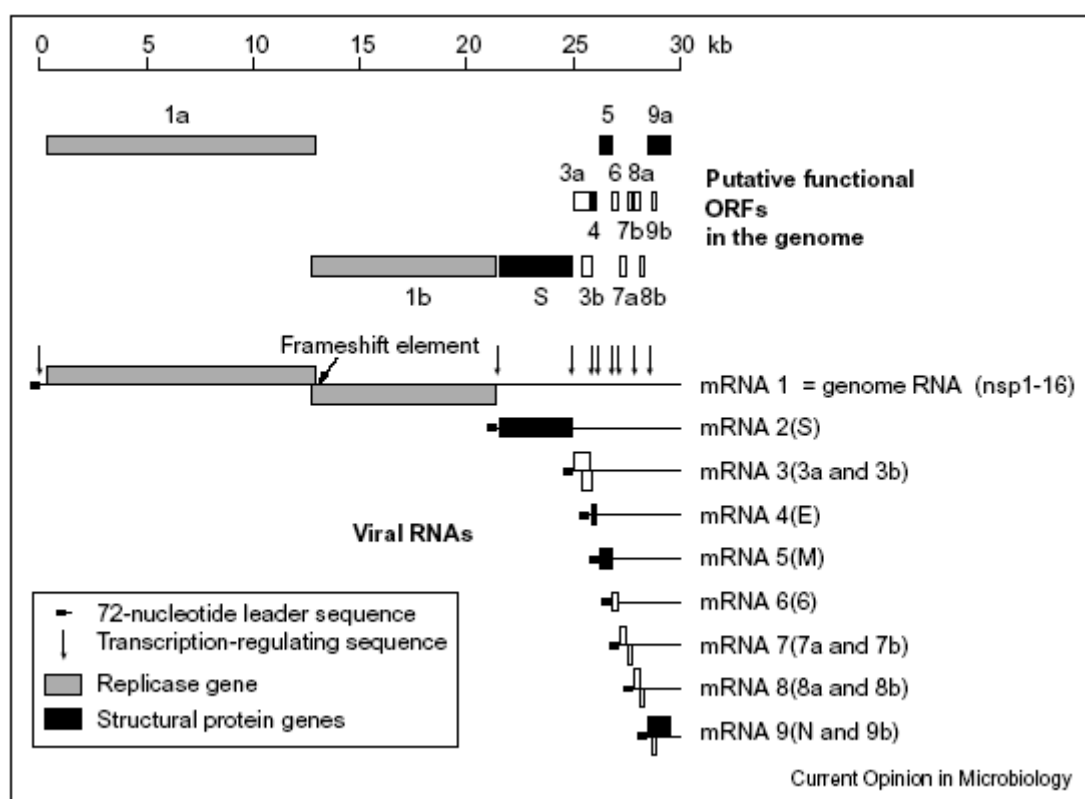


图 1-3 SARS-CoV 基因组及亚基因组表达情况示意图 (Thiel et al., 2003)

Fig.1-3 The genomic and subgenomics of SARS-CoV.

4 SARS-CoV 的受体

SARS-CoV的S蛋白同其它冠状病毒的S蛋白一样，是病毒粒子中的一种重要的结构蛋白，它介导病毒与受体的结合，在病毒感染细胞的第一步发挥重要作用。病毒与细胞受体的结合是入侵细胞的第一步也是必需步骤，而与受体结合的病毒蛋白外部结构域是决定病毒的细胞嗜性的关键因子。SARS-CoV的受体结构域位于S蛋白的S1部分中。这与其它动物冠状病毒相似，如冠状病毒229E S蛋白的受体结合结构域在第407~547氨基酸残基区，与受体金属肽酶 CD13结合 (Bonavia等, 2003; Gallagher等, 2001)，而MHV S蛋白的第1~330氨基酸残基区域与受体癌胚抗原相关细胞粘附分子1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1) (Gallagher等, 2001; Taguchi等, 1995) 结合。YU等 (Yu XJ等, 2003) 根据序列分析发现SARS冠状病毒S蛋白有两个疏水区，与以氨基肽酶N (Aminopeptidase N, APN) /CD13分子为细胞受体的冠状病毒血清1群人呼吸道冠状病毒和猪传染性胃肠炎病毒S糖蛋白相似，其中一个在整个蛋白的N端并且带有一个1型信号肽序列，另外一个C端包含一个穿膜区和一个位于膜内的富含半胱氨酸尾。通过生物信息学蛋白质相互作用分析和分子建模分析，发现SARS冠状病毒S蛋白中由第757~761

氨基酸残基组成的结构域可与CD13分子中第585~653残基结构域相互作用,推测CD13分子可能是SARS冠状病毒的受体,与SARS病毒的感染相关(Bosch等,2004)。但是Li W等(2003)通过实验表明SARS-CoV的受体是一种金属肽酶血管紧张素转换酶2(ACE2),他们将S1与免疫球蛋白分子融合表达,然后与SARS-CoV容许性细胞Vero E6的裂解物进行免疫沉淀,通过蛋白分析发现ACE2与S1具有很高的亲和力。而且抗ACE2的抗体能抑制SARS-CoV对容许细胞的感染,当非容许性细胞在表达ACE2后能支持病毒的复制。而且后来还有人用不同的方法证明了ACE2为SARS-CoV的受体(Wang P等,2004)。将不同截短的S蛋白片段进行可溶性表达后,分析它们与受体的亲和力发现S蛋白与受体结合的最小结构域由第318-510氨基酸残基组成(Babcock等,2004; Wong SK等,2004; Xiao等,2003)。

美国科罗拉多的科学家又发现了它的一个新的受体。他们将构建在口腔疱疹病毒上的人类肺组织 cDNA 大规模转染 CHO 细胞,然后用 SARS 冠状病毒的两个 Spike 铆钉蛋白 S590 和 S1180 与之结合,从而分选出阳性细胞。对这些细胞内的转染基因进行测序后发现,它们都含有 CD209L 的基因。将过表达该受体的 CHO 细胞感染 SARS 病毒后,RT-PCR 和 real time PCR 证实病毒在细胞里的扩增明显增强,细胞对病毒更加敏感。免疫组化表明,人类的二型肺泡上皮和血管内皮都表达 CD209L。这一新发现,使我们对 SARS 冠状病毒的致病过程有了更进一步的认识,为治疗提供了新的思路(Jeffers 等,2004)。

5 SARS-CoV 的包装信号

在病毒感染细胞内,病毒基因组和病毒结构蛋白通过分子间相互作用和识别,选择性地、特异地结合组装成子病毒的过程称为包装。包装信号在病毒包装过程中起着重要作用。对于冠状病毒的包装过程现在还知之甚少,现在只对鼠肝炎病毒(MHV)和牛冠状病毒(BCoV)的包装信号有所了解。MHV 的包装信号为位于 ORF1b 内距基因组 5'端约 20bp 位置的一长为 69bp 的序列,它可以将非病毒基因组 RNA 包装到 MHV 病毒粒子中,这段序列形成一突出的茎环结构,对这一茎环结构进行突变可以破坏其包装能力(Woo 等,1997)。BCoV 也有相似的包装信号,它同样可以将非病毒基因组序列包装进入 BCoV 中(Cologna & Hogue,2000)。比较分析 MHV 和 BCoV 的包装信号发现它们所在区域的一级结构高度易变而形成保守的茎环二级结构,保守的茎环二级结构在与 N 蛋白的相互作用中发挥着重要的作用。QIN 等(Qin L 等,2003)用多序列对比、二级结构预测和突变分析等生物信息学手段来分析预测 SARS 冠状病毒基因组的包装信号,发现在 SARS 冠状病毒基因组的 ORF1b 上存在类似的高变区,且形成相似的茎环二级结构,推测包装信号位于这一区域内。

6 SARS-CoV 基因组编码蛋白

成熟的冠状病毒颗粒直径约为 60 至 220nm 不等。其形态学上最显著的特征在于,在病毒包膜外,有明显的棒状膜外粒子。病毒包膜主要包括三种糖蛋白:S 蛋白(Spike Protein)、M 蛋白(Membrane Protein)、E 蛋白(Envelope Protein)。在部分毒株中还能找到一种 HE 蛋白(Haemagglutinin-esterase)。S 蛋白为伸出包膜的棒状糖蛋白,它在病毒与宿主细胞表面受体结

合及介导膜融合进入细胞的过程中起关键性作用,也是冠状病毒主要的抗原蛋白。M 蛋白是为内核衣壳的主要组成成分,也存在于病毒粒子的包膜中,是病毒颗粒和感染细胞中最丰富的糖蛋白。它是一种跨膜蛋白,具有三个结构域:N 端短的膜外结构域、3 次跨膜结构域和 C 端膜内结构域 (Armstrong 等, 1984)。M 蛋白在病毒的包膜形成与出芽过程中起重要作用。E 蛋白是一种相对较小的蛋白质,主要散在分布于病毒包膜上,对 E 蛋白的作用曾经在很长一段时间内认为它是可有可无的,但随后的研究显示它在病毒的生活周期中发挥着重要的作用 (Bos 等, 1996)。HE 蛋白又称 E3 蛋白,HE 蛋白存在于第二血清型冠状病毒和第三血清型中的火鸡冠状病毒中,通过二硫键形成分子量约为 65-70kD 的二聚体,与 C 型流感病毒的 HE 有 30% 同源性。HE 的酯酶活性可降解唾液酸,它参与病毒体从宿主细胞中释放,能与 9-O-乙酰神经氨酸结合。

目前对 SARS 冠状病毒蛋白质的研究,主要集中在对基因组分析所得的核酸与氨基酸序列,利用生物信息学的方法与工具,进行结构与功能的初步预测。根据已发表的文献现对 SARS 冠状病毒基因组可能编码蛋白作一概括。

6.1 RNA 聚合酶基因区域编码产物

SARS CoV RNA 聚合酶的编码区占了约全基因组三分之二的部分。此区域可能表达一个长约 7000 个氨基酸的复合蛋白。复合蛋白在自身催化水解在 14 个可能的蛋白质 (putative protein)。该区域由两个 ORF 组成:ORF1a(265~13,398), ORF1b(13,398~21,485),其间约在 13392~13398 位发生了-1 位的翻译移位而被分割表达为两个肽段 (Marra 等, 2003; Snijder 等, 2003; Qin ED 等, 2003; Thiel 等, 2003)。

经蛋白质结构域与位点分析表明,在 ORF1a 与 ORF1b 编码的复合蛋白中,除含有 RNA 聚合酶核心之外,还可能含有与鼠肝炎病毒类似的磷酸脂酶结构域 (PLP^{PRO})、胰凝乳蛋白酶样结构域 (3CL^{PRO}) 和一些疏水结构域。Anand 等 (2003) 以及 Xiong 等 (2003) 发表了 SARS 冠状病毒主要蛋白酶的三级结构,并对于该蛋白的高级结构特征和已知的蛋白酶化学抑制剂的结合特征进行了详尽的分析,给出了一种可能的作为药物筛选先导物的重要抑制剂-AG7088。为抗 SARS 药物设计和筛选提供了重要的结构依据。

6.2 S 蛋白 (Spike Protein)

S 蛋白是冠状病毒表面最重的膜蛋白。它由两个结构域组成,靠近 N 端的部分形成一个球状结构域,靠近 C 端的部分形成一个穿膜的棒状结构。对已知的冠状病毒的研究已经证明,S 蛋白在病毒入侵细胞、病毒与细胞受体结合以及决定病毒的细胞嗜性方面发挥重要作用。S 蛋白前体在宿主细胞质中合成以后会被切成两个部分 S1 和 S2。其中 S1 形成成熟蛋白的球状部分,S2 形成成熟蛋白的棒状分,包括一个 N helix,一个 M helix,一个 C Helix 和一个穿膜部分。S1 和 S2 之间通过分子间作用力相互结合。S2 的穿膜部分把整个 S 蛋白固定在病毒外壳膜上。SARS 冠状病毒的 S 蛋白长度为 1255 个氨基酸,是结构蛋白区编码的最大的蛋白质。北京大学医学部生物信息中心对 SARS 冠状病毒基因组编码的可能蛋白进行了序列分析与结构预测,发现整个蛋白中

可能有一个球状结构域,提示可能为 S 蛋白的 S1 部分。穿膜区预测则发现在 1197~1218 氨基酸间有一段穿膜序列,推测可能就是 S 蛋白和病毒外壳膜结合的位置。通过对二级结构的预测发现,在约 729~770,879~1016,1164~1185 外分别有一个 Helix 区域,提示可能为 S2 中的 N/M/C helix,与病毒外壳膜和宿主细胞膜的融合有关。N 端 1~13 位氨基酸可能为信号肽序列(芮伟等,2003)。S 蛋白是一个高度糖基化的蛋白,它含有 23 个保守的 N 连接糖基化位点(Marra 等,2003;Rota 等,2003)。

SARS 冠状病毒 S 蛋白介导病毒进入宿主细胞(Tripet 等,2004)。在病毒粒子表面,S 蛋白以三聚体的形式存在,它是一种典型的 I 型病毒融合蛋白,含有融合肽序列和两个特征性的七肽重复序列,分别为 HR-N 和 HR-C 或者 HR1 和 HR2。在病毒蛋白的外结构域内形成一种卷曲-卷曲结构。在它们介导病毒和宿主细胞膜的融合时,首先是融合肽插入细胞膜,然后 HR1 向回折叠与 HR2 结合,形成一个更稳定的 6-螺旋束。6-螺旋束的形成使病毒与细胞表面更加接近而促进了膜融合。所以七肽重复序列区是抗病毒药物靶标,当用外源 HR2 区同源序列多肽作用病毒时,它可以与 HR1 区结合,这样 HR1 不能回折与 HR 结合,阻止了 6-螺旋束的形成,也就抑制了病毒与细胞的膜融合,进而抑制了病毒的细胞入侵(图 1-4)(Hofmann 等,2004)。

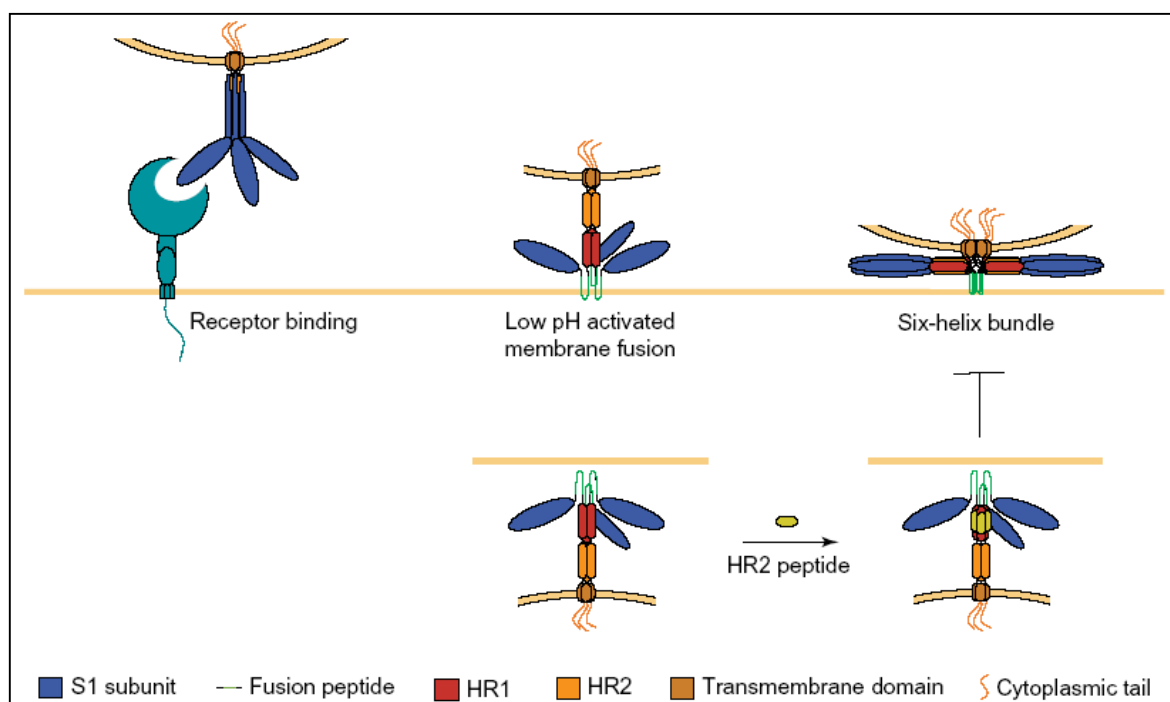


图 1-4. 病毒与细胞膜融合与抑制示意图(Hofmann 等, 2004)

Fig.1-4 Schematic presentation of membrane fusion and its inhibition.

SARS-CoV 七肽重复序列的结构与功能。近膜七肽重复序列 (HR2 membrane-proximal) 与远膜端七肽得复序列 (HR1 membrane-distal) 多肽序列在阻止病毒的膜融合作用上效率不同。结果显示仅 HR2 多肽有效, 而 HR1 则无效。而且这种阻断效率相对 MHV 的 HR2 对病毒膜融合的阻断效果而言要低很多。SARS-CoV HR2, HR1 复合物对热的稳定性较之 MHV 的也要低 (Bosch 等, 2004)。

6.3 N 蛋白

N 蛋白是冠状病毒中另一种重要的结构蛋白。在冠状病毒颗粒中, N 蛋白位于病毒颗粒的核心部分, 以和病毒基因组 RNA 结合的形式存在。N 蛋白对于病毒基因组 RNA 特征性序列的识别及与其它结构蛋白的相互作用对于病毒粒子的准确组装有重要意义。

N 蛋白 SARS 是冠状病毒结构蛋白中第二大蛋白, 长度为 422 个氨基酸。对 SARS 冠状病毒和其他冠状病毒的氨基酸序列同源性分析发现, 尽管 N 蛋白整体氨基酸同源性很低, 但是在局部区域存在着氨基酸序列高保守的基序。冠状病毒 N 蛋白有三个重要的结构域, 其中第二个是 RNA 结合结构域 (Parker 等, 1990; Cologna 等, 2000b)。而在 SARS-CoV N 蛋白第 178-205 位氨基酸区域存在一个 SRXX 富集区, 而鼠肝炎病毒的相应区域正好是 RNA 结合区, 因而推测该区域可能是 SARS N 蛋白的 RNA 结合区的一部分 (芮伟等, 2003; Shi 等, 2003)。

6.4 M 蛋白

M 蛋白是一种跨膜糖蛋白, 它与 S 蛋白的结合, 被认为是冠状病毒颗粒组装过程中的又一个关键信号。SARS 冠状病毒 M 蛋白长 221 个氨基酸。对其序列分析表明: 在其 15~37, 50~72 和 77~99 段, 分别存在三个疏水跨膜区。其 C 末端的 121 个氨基酸则位于病毒粒子内部, 推测是与病毒核衣壳相互作用的部分 (Marra 等, 2003)。

6.5 E 蛋白

SARS 病毒的 E 蛋白是最小的结构蛋白, 仅有 76 个氨基酸。生物信息学分析显示其 12~34 位存在 螺旋结构的跨膜区, C 末端和一个 46 氨基酸的疏水区域位于病毒包膜外 (Marra 等, 2003)。在靠近包膜内侧有两个 片层结构, 分别位于第 45~51 位 (片层) 和 55~61 位 (片层) 氨基酸残基, 其中 片层 可能通过氢键与包膜表面相结合, 该片层中水相溶液中解折叠成自由结构。SARS 病毒的 E 蛋白中的关键氨基酸残基比其它动物冠状病毒 E 蛋白更保守, 此外 E 蛋白氨基酸序列与其它动物冠状病毒 E 蛋白相比较同源性很低, 只有 17%~23%, 其中和鼠肝炎病毒 E 蛋白同源性最高。E 蛋白中穿膜区要比其它区域更保守 (Shen 等, 2003)。

6.6 其它未知蛋白

在 SARS 基因组中存在多个 ORF 的编码蛋白在已知蛋白质中找不到任何同源序列。对于这类推测蛋白质, 加拿大等研究小组利用已有的工具软件对其氨基酸序列特征进行了初步的分析,

对其分布或者功能特征做出了粗略推断 (Marra 等, 2003; Qin ED 等, 2003; Rota 等, 2003)。由于没有同源序列作为参照, 该预测结果的准确性均值得慎重考虑, 只能等待进一步的实验性工作予以证实。

7 SARS 冠状病毒 S 蛋白抗原表位的研究进展

Choy 等 (2004) 用生物信息学预测和结构分析的方法, 选取 S 蛋白中的 6 个肽段合成多肽后分别对家兔和猴子进行免疫, 结果表明肽段 788~820 和 1002~1030 能诱导产生 SARS-CoV S 蛋白特异的抗体, 并且用截短的重组蛋白也得到了相似的结果。实验表明这两个片段是 S 蛋白的免疫原性区域。

Wang J 等 (2003) 对结构蛋白氨基酸线性序列进行亲水性和表面可及性等参数分析, 从 S 蛋白选取了 18 个预测表位, 人工合成多肽后用 SARS 康复血清进行免疫反应性扫描。结果发现多肽 S599 与 SARS 康复患者血清有较强的反应, 且此反应强度与 SARS 病毒抗原反应的强度相当, 证明此多肽为 S 蛋白的抗原表位, 序列为: Q₅₉₉DVNCTDVSTAIHADQLTPAWR₆₂₀。

Li J 等 (2003) 根据对 S 蛋白的抗原性进行预测, 选取了总数为 66 个的预测表位, 这些序列覆盖了 S 蛋白的 68.4%。这些预测表位多肽经合成后用 SARS 患者康复血清进行免疫学反应性扫描。结果找到三个强反应多肽, 分别为 S301~322; S599~620; S1130~1147。

Ren 等 (2003) 也通过类似的方法, 即先分析预测, 后合成多肽并与 SARS 康复血清进行 ELISA 免疫反应扫描, 发现了 S469~882 区间含有抗原表位, 其中一个表位为 S599~620。

Zhou 等 (2004) 用重组 S 蛋白片段为抗原, 制备了单克隆抗体, 对其中两株有中和活性的单克隆抗体进行了表位鉴定, 鉴定出两个长度均为 20AA 的中和表位, 分别为 S607~627 和 S548~567。

Zhang H 等 (2004) 对覆盖 S2 全长的 12 个部分重叠的多肽进行了融合表达, 用 SARS 康复血清对融合蛋白组进行 ELISA 扫描, 找到两个抗原表位 S803~828 和 S1061~1093, 又进一步用两个表位融合蛋白免疫动物, 发现表位 S803~828 融合蛋白能诱导中和抗体。

He Y 等 (2004b) 合成一套总数为 168 个覆盖 S 蛋白全长的多肽, 然后用 SARS 康复患者血清进行 ELISA 反应扫描, 发现了四个免疫优势决定区域。其中 S 蛋白中部区 (528~635AA) 是主要的免疫优势决定区, 在此区内的一个多肽 S603~634 与所有 42 份 SARS 患者血清都呈阳性反应, 表明此序列为 S 蛋白的一个免疫优势表位。

细胞免疫在病毒感染与免疫中发挥重要作用。研究表明 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTLs) 在呼吸道合胞体病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 感染中无论是对病毒的清除还是在诱导免疫病理损伤中都起重要作用 (Openshaw 等, 1995; Ostler 等, 2002; Brandenburg 等, 2000), 这种作用是通过递呈在细胞表面的 T 细胞表位与 MHC I 类分子结合来实现的。在 SARS 冠状病毒感染中 CTL 可能在回复期对病毒的清除起重要作用, 同时在疾病的早期阶段也可能在免疫病理损伤

中发挥作用 (Wang YD等, 2004b)。然而这其中的具体机制还不清楚。Wang B等(2004)通过测定一系列合成9肽与HLA-A *0201分子的亲和力,再测定有高亲和力的肽在体内对HLA-A2.1/Kb转基因鼠和在体外对HLA-A2.1阳性人外周血淋巴细胞诱导特异的CTL反应的能力。鉴定出了一个T细胞表位SSp-1 (RLNEVAKNL)。Wang YD等 (2004b) 通过在线数据库分析T细胞表位选取并合成了数个9肽序列,再分析9肽与HLA-A2分子的亲和力结果有两个多肽S978 (LITGRLQSL)和S1203 (FIAGLIAIV)与HLA-A2具有高亲和力。这两个9肽能特异地诱导HLA-A2阳性SARS康复患者T淋巴细胞释放IFN- γ 。

8 SARS冠状病毒N蛋白抗原表位的研究进展

N蛋白是SARS-CoV最为保守的结构蛋白,在感染细胞内表达量最大,抗体产生时间也最早,持续时间长,是理想的检测靶蛋白。对N蛋白抗原表位进行鉴定对建立以表位为基础的诊断方法有重要意义。而且N蛋白在病毒感染的细胞免疫中也可能发挥重要作用。所以对N蛋白的T细胞表位进行鉴定还有助于SARS疫苗的设计研究。

经生物信息学分析预测N蛋白的抗原表位,后人工合成多肽,再用SARS康复血清进行免疫反应性扫描的方法,已经鉴定出了数个N蛋白抗原表位。N66~87, N385~407 (Wang J等, 2003)。N371~390 (Wang J等, 2003; Li S等2003)。Lin等(2003)对两个预测表位进行合成以及融合表达后鉴定了一个N蛋白抗原表位, N1 (P21TDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQ44)。Chen Z等 (2004)对N蛋白有及覆盖N蛋白的多个短肽序列进行了克隆和融合表达,将融合蛋白制成N蛋白特异的蛋白芯片,然后用SARS康复血清对芯片进行免疫反应扫描,结果鉴定出了四个抗原表位,分别为EP1 (51~71), EP2 (134~208), EP3 (249~273)和EP4 (349~422),其中EP2和EP4是线性表位,而EP1和EP2以及EP3和EP4可分别形成构象表位。

9 SARS 的免疫学及分子生物学诊断方法研究进展

在该病开始发生及流行时缺乏特异的检测方法,对SARS的诊断主要根据临床表现以及排除性诊断。密切接触史,有流感样症状,呼吸道症状,肺部浸润病灶,白细胞计数正常或降低,淋巴细胞减少,抗生素治疗无效是主要诊断依据。随着各项研究的迅速开展,各种免疫学,分子生物学诊断方法相继有了报道,其中很大一部分在2003~2004年SARS流行中后期的临床诊断中发挥了重大作用。

9.1 分子诊断方法

聚合酶链式反应 (PCR) 检测病原基因的方法速度快,范围广,可批量检测样本。对SARS冠状病毒基因RNA,可以用PCR方法从各种标本如血、便、呼吸道分泌物或组织中检出。特异性的引物是PCR测试方法中的主要因素,已经由世界卫生组织的实验室网络在世界卫生组织网站上公布。由WHO实验室网络成员提供的许多PCR方法资料可在WHO网上获得 (<http://www.who.int/csr/SARS/primers/en/>)。另外,可获得Bernhard Nocht研究所

(<http://www.bni-hamburg.de/>) 包含引物及阴阳性对照的 5'-核苷酸 RT-PCR 试剂盒 (<http://www.artusbiotech.de>)。通过欧洲有关外来病毒感染网 (ENIVD; <http://www.enivd.de>) 可获得诊断用的灭活标准制品。ENIVD 还备有 SARS 化验的国际外部质量方案。但这项技术还存在假阴性问题,有假象,所以不够准确。阴性的测试结果并不能排除病人中有 SARS 病毒的存在。PCR 方法的敏感性高,可以重复检测出只有 10 个拷贝的病毒 RNA (Mahony 等, 2003)。但由于缺乏实验室质量控制而导致的实验室样品的污染,能够导致假阳性结果的出现。虽然 PCR 方法可以要检出低至 10 个拷贝的病毒 RNA,但临床应用中 PCR 方法约只能检出 50%,因为访方法的成败受各种样品预处理的影响,包括取样类型取样时间等。检出率较高的样品包括鼻咽拭子,鼻咽分泌物,喉拭子和粪便;而合适的取样时间则为出现症状后约 10 天,此时病毒载量达到高峰 (Peiris 等, 2003b; Tang 等, 2003; Hsueh 等, 2003)。据报道一种经改良后检测鼻咽吸出物中病毒 RNA 的 PCR 方法的检出率可达 80%,该方法可检测症状出现后 1 至 3 天的样品 (Poon 等, 2003)。

对于存在有必要的质量控制程序的 PCR 测试的阳性结果:推荐用于 SARS 冠状病毒的实验室测试是有非常好的特异性的,阳性结果意味着在样品中有 SARS 冠状病毒的基因的存在。但并非意味着有活病毒的存在或者是存在着大量的病毒足够感染其他人。

PCR 测试的阴性结果并不能够排除 SARS 病毒的存在。用 PCR 方法对 SARS 冠状病毒进行测试,由于以下几方面的原因结果可能出现阴性:病人没有被 SARS 冠状病毒所感染;病例是由其它的病原体(病毒、细菌和真菌)感染引起的,或者是由于非感染性的原因引起的;目前的测试方法需要进一步的改进以提高其灵敏性;样品并不是在有病毒或基因物质存在的时候收集到的。病毒和基因物质有可能仅仅存在于一个较短的时期内,取决于用于测试的样品的种类。

9.2 病毒分离

来自 SARS 病例的样品中的病毒(例如呼吸道分泌物、血液或者粪便),通过接种细胞培养和病毒增殖也能测到。一旦分离到了病毒,将做进一步的鉴别以证实是否是 SARS 病毒。细胞培养是条件非常苛刻的测试,但目前(除了动物测试外)仅仅表明了有活病毒的存在。阳性的细胞培养结果表明在所测试的样品中有活的 SARS 冠状病毒的存在。而阴性的细胞培养结果并不能排除 SARS 冠状病毒的存在。病毒培养方法的敏感性要比 PCR 方法低 (Hsueh 等, 2003)。

9.3 病毒抗原检测

对病毒抗原物质的检测也是检测 SARS 病毒的一种依据。SARS-CoV 感染细胞内 N 蛋白表达量大,感染后可检出时间早 (Di 等, 2005),适于作为检测靶蛋白。最常见的是 ELISA 方法 (Lau 等, 2004)。Che 等 (2004) 报道了一种 N 蛋白特异的单克隆抗体建立的夹心抗原捕获 ELISA 方法,用该方法可以检出血清样品中 100 pg/ml 至 3.2 ng/ml 的 N 蛋白。并且发现感染后第 6 至 10 天血清中 N 蛋白含量达到高峰。访方法敏感、特异,可以进行早期诊断和病毒感染监测。Chang 等 (2004) 报道了用 S 蛋白肽和重组 N 蛋白诱导的特异性抗体可以经 Western blot 和免疫荧光试

验特异地检测 SARS-CoV。

9.4 抗体测试

检测病毒结构蛋白的抗体主要有 ELISA 法 (Guan M 等, 2004a; 2004b;), 间接免疫荧光试验 (IFA) (He Q 等, 2005; Manopo 等, 2005;) 和 Western blot (He Q 等, 2004; Woo 等, 2004b) 方法。这些测试方法用于由 SARS 冠状病毒感染所引起的抗体应答的测试。不同类型的抗体 (IgM、IgG 和 IgA) 是在不同的感染过程中出现的并且抗体水平会发生改变 (Woo 等, 2004a)。在感染的早期这些抗体有可能是测不到的。IgG 通常在病例恢复后仍然可以测到 (Peiris 等, 2003b; Li G 等, 2003; Tang 等, 2003)。而对于 SARS-CoV 的各个结构蛋白而言, 适于用来做抗体检测的是 N 蛋白、S 蛋白和 SARS-CoV 的一个特有蛋白 U274 (Tan YJ 等, 2004), 其中 N 蛋白抗体产生最早, 适于早期诊断; 17.5% 的病人在症状出现后第 1 至 7 天出现抗体, 而 80% 的病例在第 8~14 天出现抗体, 第 15 天后则有 90% 的病例出现抗体, 之后抗体滴度一直上升至第 70 天, 这种高滴度抗体可以再持续 3 个月 (Liu X 等, 2004)。而在疾病的急性期, 即感染后的第 2 至第 9 天, 一般检不出 S 蛋白抗体。U274 蛋白虽为 SARS-CoV 所特有, 但它的检出率比前两种蛋白要低 (Tan YJ 等, 2004)。

Huang 等 (2004) 用 Western blot 和 ELISA 方法评价了用重组 S 蛋白和 N 蛋白为抗原对病人血清的检测效果。结果表明 Western blot 对病毒感染后的体液免疫反应很有用, 而该方法中, 用重组 N 蛋白作抗原比用重组 S 蛋白作抗原更高的检出率。用 N 蛋白为抗原的 ELISA 方法可以对病毒感染进行诊断, 是一种敏感和快速的方法 (Leung 等, 2004)。但 SARS-CoV 的 N 蛋白可能与其它人冠状病毒有交叉反应而导致假阳性结果。Woo 等 (2004b) 报道, 用重组的 SARS-CoV N 蛋白为抗原的 ELISA 方法对 21 例 HCoV-OC43 感染者康复期血清检出了 3 例阳性; 对 7 例 HCoV-229E 感染者康复期血清检出了 1 例; 而用重组融合 S 蛋白多肽为抗原的 Western blot 方法则未检出阳性结果。基于 S 蛋白的 Western blot 方法对 SARS-CoV 抗体的检测也是有效的, 可以结合以 N 蛋白为抗原的 ELISA 方法同时进行, 以提高检出率和正确率, 而 S 蛋白中 S2 部分比其它部分有效 (Wang YD 等, 2004a)。

抗体实验结果阳性表明以前感染过 SARS-CoV。由阴性转为阳性或抗体滴度增加 4 倍, 提示近期感染 SARS-CoV。发病 21 天后抗体试验结果仍为阴性, 提示可能没发生 SARS-CoV 感染。目前为止, 筛选检查的对照人群似乎并没有抗 SARS-CoV 的血清流行病背景。抗体试验可间接诊断 SARS-CoV 感染但不适于急性疾病。与其它病毒检测方法相反, 它具有不依赖样本类型和时间的优势。抗体实验结果阳性表明以前感染过 SARS-CoV。由阴性转为阳性或抗体增加 4 倍, 提示近期感染 SARS-CoV。发病 21 天后抗体试验结果仍为阴性, 提示可能没发生 SARS-CoV 感染。抗体试验可间接诊断 SARS-CoV 感染但不适于急性疾病。与其它病毒检测方法相反, 它具有不依赖于样本类型和时间的优势。

10 SARS 防治研究进展

10.1 药物治疗

目前SARS还缺乏特效的治疗,目前的治疗包括抗病毒治疗如利马伟林,奥司他伟,病毒唑,干扰素;用激素降低免疫系统对肺的损伤;用抗生素潜在的细菌感染;辨证的中西医结合治疗以及其它的对症支持治疗等(So等, 2003; Nie QH等, 2003; Tsang K等, 2003; Fowler等, 2003; Lew等, 2003; Poutanen等, 2003; Lee等, 2003; Tsang KW等, 2003; Enserink等, 2004b)。中国的钟南山院士提出了四条有效的治疗经验:在发病初期病人出现类似流感症状时,用中西医结合方法,清热解毒治疗有效;肺纹理或病理改变酷似纤维化病程时,及时用大剂量糖皮质激素;病人出现缺氧呼吸困难时,及早采用无创通气;对中长期严重免疫功能低下者,关注患者的继发感染。临床应用证明这套治疗方案是有效的。在实验室里对抗病毒药物进行筛选发现,体外实验中SARS-CoV敏感的药物有干扰素、甘草甜素(glycyrrhizin),利血平,氯硝柳胺(niclosamide),毛地黄黄酮,和蛋白酶抑制剂等(Wu CY等, 2004; Wu CJ等, 2004; Chen F等, 2004; Yi等, 2004; Yamamoto N等, 2004; Shigeta等, 2005),而对病毒唑的效果则有不同的报道结果(Tan EL等, 2004; Booth等, 2003; Hsu等, 2003; Mazzulli T等, 2004;)。

对SARS-CoV的基因组进行分析或与其它动物冠状病毒进行类比,也可能找到潜在的药物靶位点,如主要蛋白酶3CL,螺旋酶等(Anand等, 2003; Ivanov等, 2004); SARS-CoV S蛋白的融合机制和其它动物冠状病毒的融合机制类似,同源于S2上第二七肽重复区的合成肽可以阻断病毒与宿主细胞的融合,进而阻止病毒的感染,因此合成肽也可能成为治疗SARS的一种新药(Bosch等, 2004; Liu S等, 2004);另外一类分子治疗剂为小干扰RNA分子(He ML等, 2003; Wang Z等, 2004; Zhang Y等, 2004), RNA干扰是一种新的技术,在病毒感染的临床应用上目前虽然还不成熟,但它仍被很多研究人员看好。

10.2 抗体

血清治疗是被认为是有效的,在发病的前两周内使用SARS康复病人血清进行治疗可以减少病人的住院期和发热时间以及降低死亡率。从用康复血清进行治疗的实例来看,血清的使用没有产生任何副作用,也没有发生因使用血清而传播病毒的例子发生(Nie QH等, 2003; Wong VW等, 2003; Wong VWS等, <http://www.hkmj.org.hk/hkmj/update/SARS/cr1606.htm>)。一般在SARS症状出现10天后很少能检测到病毒血症(WHO Recommendations on SARS and Blood Safety. <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/bloodsafety/en/>), 所以用康复血清进行治疗是安全的。

康复血清的使用毕竟有很大的局限性,生产有中和作用的抗体是抗体治疗的新希望。SARS-CoV结构蛋白中能诱导机体产生有中和作用抗体的主要是S蛋白(Buchholz等, 2004)。已经有很多研究小组制备筛选出了有中和作用的S蛋白特异的单克隆抗体(Berry等, 2004; Zhou等, 2004; Chou等, 2005; He Y等, 2005; Gubbins等2005;), 这些单克隆抗体都是鼠源性的,虽然它们在培养细胞中的病毒或是对带有SARS-CoV S蛋白的伪型病毒有中和作用,但直接应用于

治疗可能会存在一些问题,然而这些抗体对分析S蛋白的结构与功能以及鉴定中和抗原表位都有重要作用。研究有中和作用的人源性单克隆抗体可能在治疗中会发挥更大的作用。Sui等(2004)从非免疫人抗体库中筛选出了8个可变区单链抗体(single chain variable region fragments, scFvs),其中scFv 80R具有中和作用,可以阻断S蛋白与受体ACE2的结合,而且表位分析表明些中和抗体的表位区位于S蛋白N端第261~672氨基酸残基间。van den Brink EN等(2005)以全病毒为靶,从半合成抗体噬菌体展示库中筛选出了8株人源单克隆抗体,在四株S蛋白特异的单抗中有三株有中和作用。Greenough等(2005)用重组S蛋白免疫带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备筛选出了两株中和单克隆抗体。利用B细胞的记忆作用,直接从SARS康复患者的B细胞中克隆筛选能分泌中和抗体的B细胞克隆是一种新的制备人源单克隆抗体的方法,Traggiai等(2004)用此方法35株中和单克隆抗体,并且在以小鼠为动物模型的动物实验中证实实验有保护效果。ter Meulen J等(2004)以雪貂为动物模型,评价了人源中和性单克隆抗体对SARS-CoV感染的治疗效果,结果发现经单克隆抗体治疗后可以有效地抑制病毒在肺部的复制,阻止了肺部病变的产生和减少动物排毒。

10.3 疫苗

作为一种病毒性传染病,用疫苗预防是最好的措施。因此许多科研人员正在集中精力研制SARS疫苗。虽然SARS现在已经没有新的病例发生,而真正意义上的可商品化的疫苗的研制将依赖于SARS是否将再度流行。尽管如此,SARS疫苗的研究工作仍有必要,因为对于某些高危危险性工作者如实验室的工作人员,医护人员,以及可能为SARS-CoV宿主的动物的饲养人员而言,提前进行免疫保护是有必要的(Peiris等,2004;Zheng等,2004)。

人在自然感染SARS-CoV后可以产生中和性抗体,而这种抗体对不同病例来源的病毒都具有中和作用,且这种抗体反应可以持续很长一段时间(Nie Y等,2004)。这也提示用疫苗进行免疫可以预防该病。但是至目前为止没有SARS的二次感染病例,所以还不知道这种获得性免疫是否对再感染具有免疫保护作用。在SARS-CoV的主要结构蛋白S、M、N和E蛋白中,无论是通过重组病毒还是重组蛋白亚单位疫苗的免疫实验结果看,只有S蛋白能诱导动物机体产生保护性中和抗体(Bukreyev等,2004;Buchholta等,2004)。因此S蛋白成为研究SARS疫苗的首选靶蛋白。表达S蛋白的DNA疫苗也能诱导小鼠产生中和抗体,而且能保护活病毒对小鼠的攻击(Yang等,2004;Kim等,2004;Zeng等,2004;Zhu等,2004;Pang等,2004)。此外还有其它各种疫苗的研究报道,如腺病毒活载体疫苗(Gao等,2003),修饰致弱痘病毒载体苗(Bisht等,2004),全病毒灭活苗(Takasuka等,2003;Tang L等,2004);而且这些基因工程类疫苗中很多都用到了优化密码子的策略,以希望提高靶蛋白的表达量。总之,这些疫苗的实验结果表明S蛋白能诱导产生中和抗体而N蛋白能诱导N蛋白特异的细胞免疫。其中,中国科研人员研究的一种灭活苗已经进行第一期人体临床实验(Enserink,2004)。

也许在研究SARS疫苗的同时,研究人员应该考虑借鉴其它动物冠状病毒疫苗的研究经验(Cavanagh等,2003),其中研究人员面临的一个问题是作为一种RNA病毒,病毒的变异是肯

定的，那么疫苗对不同分离株以及不同时间出现的病毒的免疫保护是否有效；另外一个问题是动物冠状病毒中存在如猫传染性腹膜炎病毒病这样的例子，这种病毒的提前免疫不能提供病毒的攻击保护，相反地是加强了疾病的程度（Olsen 等，1993）。这种现象也许不是猫传染性腹膜炎病毒所特有的（Enserink 等，2004），如 Weingartl 等（2004）报道表达 S 蛋白的重组痘苗病毒免疫后的雪貂在 SARS-CoV 的再攻击后加重了肝脏的病变，所以 SARS 疫苗的安全性应该引起研究人员更大的注意。

11 存在的问题与展望

总之，SARS-CoV 是一种新的冠状病毒，它是 SARS 这种烈性传染病的病源。至目前为止，我们只是对它的致病机理与流行病学等方面有了一个很初步的了解。毕竟这种疾病以前在人类中从未出现过，有类要能成功有效地控制与预防这种疾病，还有很多方面的研究工作要做。（1）SARS-CoV 的起源与遗传演化，病毒的生活周期与传播方式；（2）病毒的复制以及与宿主细胞的作用机制；（3）疾病的肺急性损伤机理与特异的免疫反应；（4）疾病的快速诊断与有效的病毒监测技术；（5）新型有效的药物的研究，如抑制性多肽药物等的研究（Peiris 等，2004）。随着世界范围内对该病基础研究的快速进展，将会开发出更多更有效的药物与疫苗，人类终将会对该病有一个更全面的认识与了解，最终成功控制该病。

12 本研究的目的是与意义

本研究的目的是主要是分析鉴定 SARS-CoV 结构蛋白特别是 S 蛋白的免疫优势区域，精细鉴定抗原表位结构序列与特性，为进一步研究 S 蛋白结构与功能以及为基于表位的诊断和治疗应用研究提供理论基础。主要应用的方法包括运用生物信息学手段分析预测抗原表位，S 蛋白片段的原核表达与纯化，单克隆抗体及多克隆抗体的制备，短肽组的融合表达与纯化，ELISA 与 Western blot 免疫反应分析等。

SARS 是新出现的一种危害极大的传染疾病，对该病的诊断与防治工作急需开展。本研究主要内容是分析鉴定 SARS-CoV 结构蛋白的抗原表位。其主要意义在于：1、对建立以表位为基础的抗原抗体免疫学诊断方法提供直接依据；2、鉴定中和性抗原表位，为 SARS 疫苗的研究设计提供理论基础；3、对 S 蛋白主要免疫优势区域进行表位作图，为进一步的 S 蛋白结构与功能研究提供信息。

实验一 SARS冠状病毒结构蛋白表位预测及多表位嵌合基因的构建与表达

摘 要 用Lasergene软件系统分析SARS病毒结构蛋白S、M、N蛋白,通过亲水性、抗原性,表面可及性、柔韧性和二级结构 β 转角等参数选出各基因抗原优势区域序列,用这些抗原优势区域序列设计组合成四个抗原优势区域嵌合基因SSCV-A、SSCV-B、SSCV-C、SSCV-D。人工合成后插入pGEX-6p-1的BamHI和XhoI位点间,构建成融合表达质粒,转化宿主菌BL21经IPTG诱导后融合基因表达产物为可溶性蛋白。经免疫印迹试验表明重组复合抗原基因表达产物可被SARS康复患者血清所识别,表明融合蛋白具有免疫反应性。试验结果提示该融合蛋白作为SARS诊断试剂的可能性。同时也为进一步分析SARS结构蛋白基因抗原表位,对结构基因进行表位作图和研制多表位基因工程疫苗打下基础。

关键词 SARS-CoV, 嵌合基因, 原核表达, 免疫性

严重急性呼吸综合征(Severe acute respiratory syndrome, SARS)于2002年11月最早发生于我国广东省,随后该病在世界范围内多个国家中并导致数百人死亡,严重威胁人类健康。WHO在2003年4月16日宣布其病原体为一新型冠状病毒,并命名为SARS冠状病毒(SARS-CoV)(Peiris等,2003a; Drosten等,2003)。该病主要经空气飞沫传播,传染性强,如不能及时确诊治疗有致死危险,该病严重危害人类健康、生活秩序和社会经济发展。对该病目前无疫苗预防,也无特效治疗药物,但早期诊断对症治疗是行之有效的方法。所以研制SARS诊断方法是当务之急。

SARS-CoV为单链正义RNA病毒,有囊膜结构。它属于尼多病毒目(Order: Nidovirales),冠状病毒科(Family: Coronaviridae)冠状病毒属(Genus: Coronavirus)。病毒粒子直径在60~130nm之间。病毒基因组全长约为29kb,约编码11个蛋白质,有四种主要的结构蛋白,分别为纤突蛋白(Spike Protein, S),囊膜蛋白(Envelope Protein, E),膜蛋白(Membrane Protein, M)和核衣壳蛋白(Nucleoprotein, N)(Rota等,2003; Marra等,2003; Qin ED等,2003)。

SARS冠状病毒S蛋白是冠状病毒表面最重的膜蛋白,长度为1255个氨基酸,是结构蛋白区编码的最大的蛋白质。它由两个结构域组成,靠近N端的部分形成一个球状结构域,靠近C端的部分形成一个穿膜的棒状结构。对已知的冠状病毒的研究已经证明,冠状病毒S蛋白在病毒入侵细胞、病毒与细胞受体结合以及决定病毒的细胞嗜性方面发挥重要作用(Gallagher等,2001)。目前一般认为SARS-CoV S蛋白不被切割成的S1和S2两个部分,但比较其结构与功能仍将其分为S1和S2两个部分。其中S1形成成熟蛋白的球状部分,S2形成成熟蛋白的棒状分,包括一个N helix,一个M helix,一个C Helix和一个穿膜部分。S1和S2之间通过分子间作用力相互结合。S2的穿膜部分把整个S蛋白固定在病毒外壳膜上。北京大学医学部生物信息中心对SARS冠状

病毒基因组编码的可能蛋白进行了序列分析与结构预测,发现整个蛋白中可能有一个球状结构域,提示可能为S蛋白的S1部分。穿膜区预测则发现在1197~1218氨基酸间有一段穿膜序列,推测可能就是S蛋白和病毒外壳膜结合的位置。通过对二级结构的预测发现,在约729~770,879~1016,1164~1185外分别有一个Helix区域,提示可能为S2中的N/M/C helix,与病毒外壳膜和宿主细胞膜的融合有关。N端1-13位氨基酸可能为信号肽序列(芮伟等,2003)。

SARS-CoV 七肽重复序列的结构与功能。近膜七肽重复序列(HR2 membrane-proximal)与远膜端七肽得复序列(HR1 membrane-distal)多肽序列在阻止病毒的膜融合作用上效率不同。结果显示仅HR2多肽有效,而HR1则无效。而且这种阻断效率相对MHV的HR2对病毒膜融合的阻断效果而言要低很多。SARS-CoV HR2,HR1复合物对热的稳定性较之MHV的也要低(Bosch等,2004)。

N蛋白是冠状病毒中另一种重要的结构蛋白,是冠状病毒结构蛋白中第二大蛋白,长度为422个氨基酸。在冠状病毒颗粒中,N蛋白位于病毒颗粒的核心部分,以和病毒基因组RNA结合的形式存在。N蛋白对于病毒基因组RNA特征性序列的识别及与其它结构蛋白的相互作用对于病毒粒子的准确组装有重要意义。对SARS冠状病毒和其他冠状病毒的氨基酸序列同源性分析发现,尽管N蛋白整体氨基酸同源性很低,但是在局部区域存在着氨基酸序列高保守的基序。在其第178~205位氨基酸区域存在一个SRXX富集区,而鼠肝炎病毒的相应区域正好是RNA结合区,因而推测该区域可能是SARS N蛋白的RNA结合区的一部分(芮伟等,2003;Shi等,2003)。

M蛋白是一种跨膜糖蛋白,它与S蛋白的结合,被认为是冠状颗粒组装过程中的又一个关键信号。SARS冠状病毒M蛋白长221个氨基酸。对其序列分析表明:在其15~37,50~72和77~99段,分别存在三个疏水跨膜区。其C末端的121个氨基酸则位于病毒粒子内部,推测是与病毒核衣壳相互作用的部分(Drosten等,2003)。

SARS病毒的E蛋白是最小的结构蛋白,仅有76个氨基酸。生物信息学分析显示其12~34位存在螺旋结构的跨膜区,C末端和一个46氨基酸的疏水区域位于病毒包膜外(Marra等,2003)。在靠近包膜内侧有两个片层结构,分别位于第45-51位(片层)和55-61位(片层)氨基酸残基,其中片层可能通过氢键与包膜表面相结合,该片层中水相溶液中解折叠成自由结构。SARS病毒的E蛋白中的关键氨基酸残基比其它动物冠状病毒E蛋白更保守,此外E蛋白氨基酸序列与其它动物冠状病毒E蛋白相比较同源性很低,只有17%~23%,其中和鼠肝炎病毒E蛋白同源性最高。E蛋白中穿膜区要比其它区域更保守(Shen等,2003)。

本实验的目的是通过计算机分析预测,找出SARS-CoV结构蛋白基因抗原优势区域,以不同方式组合进行原核表达,以期获得特异有效的重组抗原,并用重组抗原制备高免血清,进一步研制以重组SARS抗原为基础的诊断试剂的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

质粒pGEX-6P-1、大肠杆菌Dh5 α 及BL21均为兽医生物技术国家重点实验室保存。

1.2 酶与标记物

限制性内切酶*Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI, T4 DNA连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品; IPTG, HRP标记抗人IgG为Promega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病人康复期血清由华南农业大学廖明和张桂红博士提供, 血清已经按照实验室生物安全要求灭活处理。

1.4 结构蛋白抗原表位的预测

参照已发表的SARS-CoV BJ01株S蛋白基因序列(Genbank accession no. AY278488), 运用Laser gene-DNASTAR软件包对S、M和N蛋白序列进行分析。根据亲水性(Kyte等, 1982)、表面可能性(Emini等, 1985)、抗原性(Jameson等, 1988)和二级结构特征(Chou等, 1990)对S蛋白可能包含抗原表位区进行预测分析, 选取了6个S蛋白预测表位序列, 分别命名为:S1、S2、S3、S4、S5和S6; 3个M蛋白预测表位, 分别命名为:M1、M2和M3; 3个N蛋白预测表位, 分别命名为:N1、N2和N3, 其序列及位置如表1所示。

1.5 嵌合基因的设计与合成

将预测的各结构蛋白抗原表位按以下方式进行组合连接构建四个嵌合基因, 分别为:SSCV-A (S1+S4+M1+M2+N1+N3), SSCV-B (S1+S3+S5+N1+N2+N3), SSCV-C (S2+S4+S6+M1+M2+M3), SSCV-D (S1+S2+S3+S4+S5+S6) 四个嵌合基因, 各预测表位间以非极性的甘氨酸和脯氨酸以G-P-G的形式间隔。嵌合基因两端分别加上*Bam*HI、*Xho*I酶切位点和保护性碱基。嵌合基因由大连宝生物公司合成并克隆测序, 质粒为pUC-SSCV-A, pUC-SSCV-B, pUC-SSCV-C, pUC-SSCV-D。

1.6 pGEX-SSCV融合表达载体的构建

*Bam*HI, *Xho*I双切质粒pGEX-6P-1,回收大片段;*Bam*HI, *Xho*I双切质粒pUC-SSCV (A、B、C、D),回收小片段,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DH5 α ,重组子经酶切鉴定后命名为pGEX-SSCV-A, pGEX-SSCV-B, pGEX-SSCV-C, pGEX-SSCV-D,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,质粒的连接转化参照文献进行(Sanbrook等, 1989)。

1.7 重组质粒的原核表达与纯化

将表达菌种接种于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C培养过夜后,按1:100接种于新鲜2 \times 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12,000rpm离心分离上清和沉淀;SDS-PAGE电泳检测表达情况;用不同浓度的IPTG和不同诱导时间进行表达条件的优化;培养物超声波裂解,上清用谷胱甘肽sepharose 4B RediPack亲和层析柱(Pharmacia Biotech)纯化,操作步骤按说明进行。

1.8 Western blot检测融合蛋白与SARS康复病人血清的免疫反应性

样品经SDS-PAGE电泳后,转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂乳4 $^{\circ}$ 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2h,TTBS洗三遍后浸入1:5000稀释的HRP标记羊抗人IgG抗体,室温作用1h,洗涤三次后用DAB显色。

2 结果

2.1 结构蛋白特性分析及表位预测

根据抗原性,亲水性,表面可及性(图2-1),易曲性和二级结构B转角等参数选取的各蛋白预测表位如表2-1所示:

表2-1 结构蛋白表位预测

Table 2-1. Prediction epitopes of structural protein of SARS-CoV.

结构蛋白	预测表位名称	预测表位序列	预测表位位置及长度(aa)
S	S1	NTRNIDATSTGNYN	424~437 , 14aa
	S2	KLRPFERDISNV	447~458 , 12aa
	S3	DSVRDPKTSEIL	560~571 , 12aa
	S4	AEQDRNTREVF	754~764 , 11aa
	S5	PDPLKPTKRSF	789~799 , 11aa
	S6	KNHTSPDVDLGDIS	1139~1152 , 14aa
M	M1	YSNRNRF	38~44 , 7aa
	M2	CDIKDLPKEI	158~167 , 10aa
	M3	KLNTDHAGSND	204~214 , 11aa
N	N1	MSDNGPQSNQRSAPR	1~15 , 15aa
	N2	ARPKQRRPQGLP	36~47 , 12aa
	N3	KKPRQKRTATKQ	257~268 , 12aa

aa: 氨基酸残基 amino acid residue

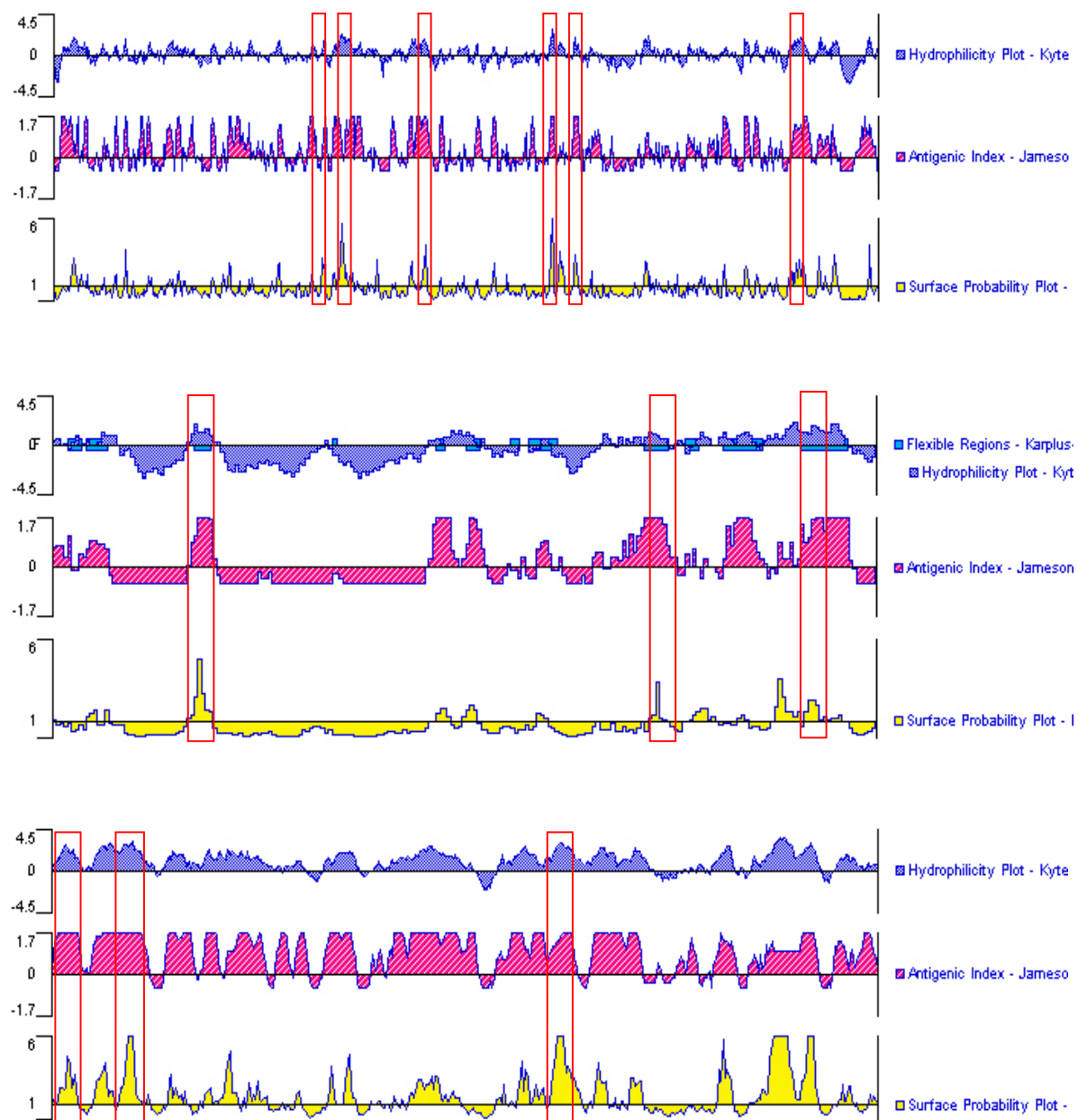


图2-1 SARS-CoV S蛋白、M蛋白、N蛋白的抗原性、亲水性和表面可及性分析

Fig.2-1 Bioinformatic analysis the hydrophilicity, antigenic and surface probability of S, M and N protein of SARS-CoV.

矩形框所示位置为所预测表位位置

2.2 嵌合基因的设计

将预测的各结构蛋白表位重新组合构建了四个嵌合基因SSCV-A、SSCV-B、SSCV-C、SSCV-D；氨基酸亲水性及侧链易曲性是衡量抗原性的两大指标，经分析嵌合基因编码产物具有良好的亲水性和免疫性，易曲性分析表明各抗原表位均显示独立的区域性（图2-2）。其序列与组合方式如下所示，大写带下划线序列为酶切位点，小写带下划线为GPG编码序列。

SSCV-A : (270bp) (S1+S4+M1+M2+N1+N3)

CTG**GGATCC**AATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAATggaccgggaGCTGA
ACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTggaccgggaTATTCTAATCGGAACAGGTTTggaccggga
TGTGACATTAAGGACCTGCCAAAAGAGATCggaccgggaATGTCTGATAATGGACCCCAATCAA
ACCAACGTAGTGCCCCCGCggaccgggaAAAAAGCCTCGCCAAAACGTACTGCCACAAAAC
AG**CTCGAG**CGG

SSCV B: (291bp) (S1+S3+S5+N1+N2+N3)

CTG**GGATCC**AATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAATggaccgggaGATTCC
GTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAggaccgggaCCTGACCCTCTAAAGCCAACTAAGAG
GTCTTTTggaccgggaATGTCTGATAATGGACCCCAATCAAACCAACGTAGTGCCCCCGCggaccg
ggaGCAAGGCCAAAACAGCGCCGACCCCAAGGTTTACCCggaccgggaAAAAAGCCTCGCCAAA
AACGTACTGCCACAAAACAG**CTCGAG**CGG

SSCV-C: (258bp) (S2+S4+S6+M1+M2+M3)

CTG**GGATCC**AAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGggaccgggaGCTGAACAGG
ATCGCAACACACGTGAAGTGTTggaccgggaAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATCTTGGC
GACATTTCAggaccgggaTATTCTAATCGGAACAGGTTTggaccgggaTGTGACATTAAGGACCTGCC
AAAAGAGATCggaccgggaAAATTAAATACAGACCACGCCGGTAGCAACGAC**CTCGAG**CGG

SSCV-D: (285bp) (S1+S2+S3+S4+S5+S6)

CTG**GGATCC**AATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAATggaccgggaAAGCT
TAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGggaccgggaGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACAT
CTGAAATATTAggaccgggaGCTGAACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTggaccgggaCCTGA
CCCTCTAAAGCCAACTAAGAGGTCTTTTggaccgggaAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATC
TTGGCGACATTTCA**CTCGAG**CGG

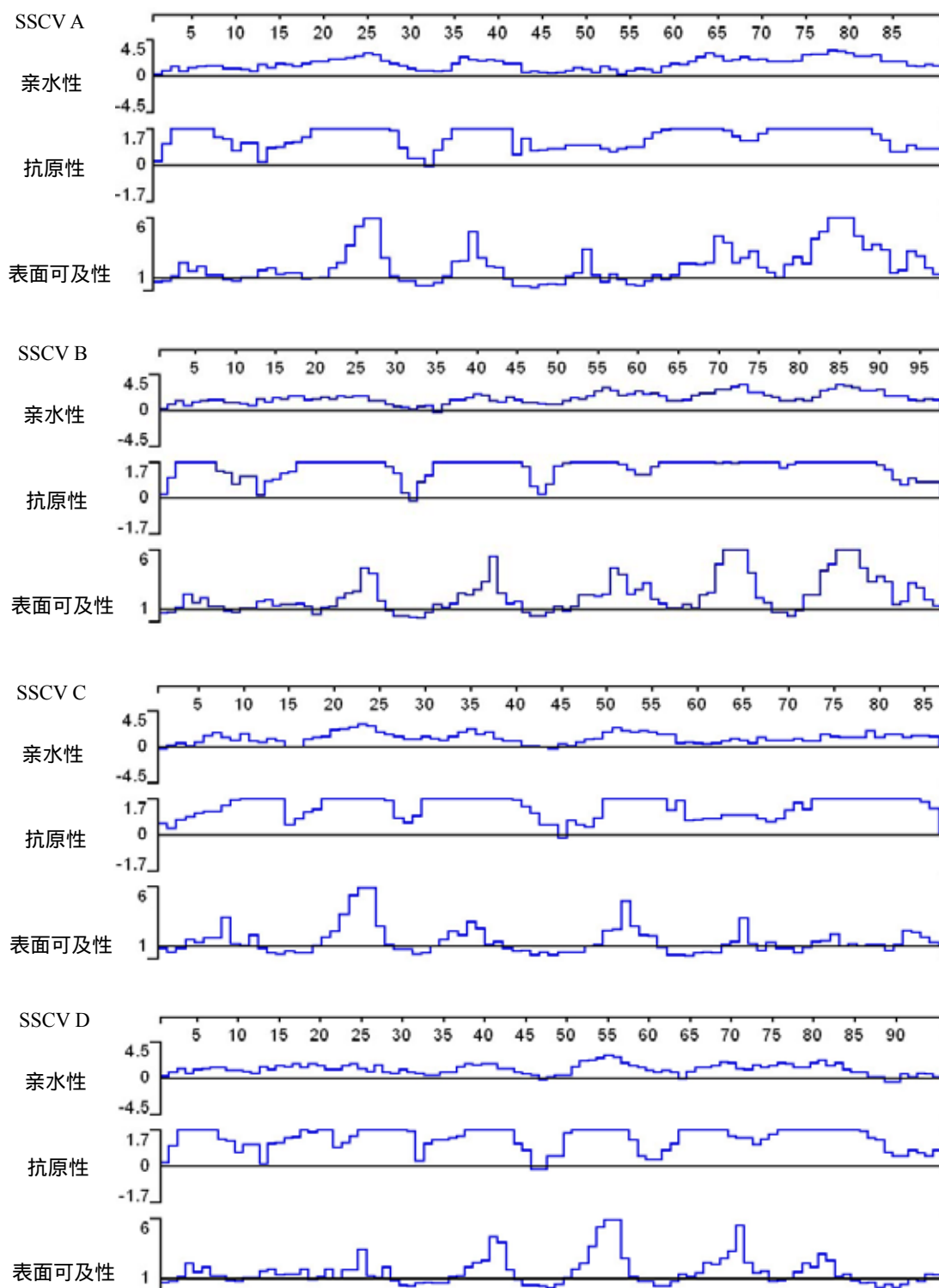


图2-2 重组嵌合蛋白的亲水性和抗原性以及表面可及性分析

Fig. 2-2 Predictions of hydrophilicity, antigenic index and surface possibility of chimeric protein SSCV-A, SSCV-B, SSCV-C and SSCV-D

2.3 融合表达质粒的构建

经连接转化后均得到了阳性重组质粒，阳性重组质粒能被*Bam*HI和*Xho*I切开，并且不能被*Eco*RI切开，与预期结果一致（图2-3）。

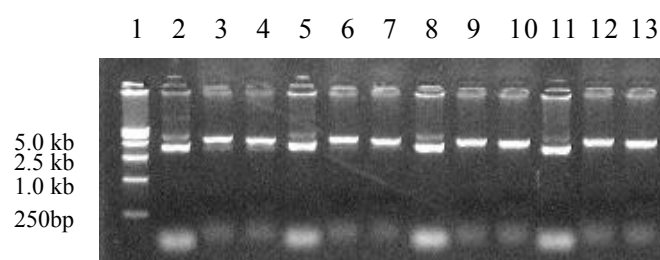


Fig.2-3 Restriction analysis of recombinant plasmids

1. DNA molecular marker; 2-4. pGEX-SSCV-A digested with *Eco*RI, *Bam*HI and *Xho*I respectively; 5-7. pGEX-SSCV-B digested with *Eco*RI, *Bam*HI and *Xho*I respectively; 8-10. pGEX-SSCV-C digested with *Eco*RI, *Bam*HI and *Xho*I respectively; 11-13. pGEX-SSCV-D digested with *Eco*RI, *Bam*HI and *Xho*I respectively

2.4 GST-SSCV融合蛋白的表达

重组质粒转化表达宿主菌BL21后经IPTG诱导均表达与预测值大小相符的特异型蛋白带，大小分别约为GST-SSCV/A 34.4kD, GST-SSCV/B 35.0kD, GST-SSCV/C 34.0kD, GST-SSCV/D 34.9kD（图2-4）；表达融合蛋白存在于表达菌体超声裂解后的上清中。经不同IPTG浓度诱导结果显示，在IPTG浓度为0.05mmol/L时表达量最高；经不同诱导时间的结果显示，在4h以后表达量趋于稳定。

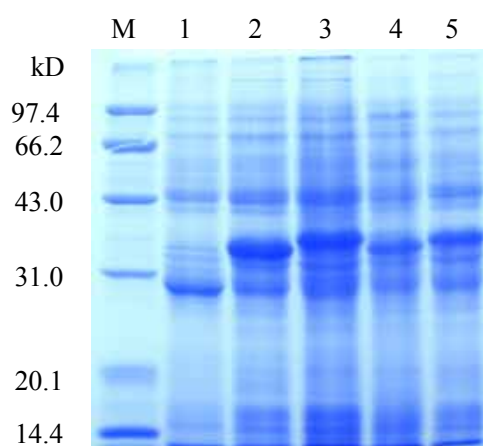


图2-4 重组质粒诱导表达的

SDS-PAGE分析

Fig.2-4 SDS-PAGE of recombinant fusion protein and control.

M: low molecular protein standards;

1: control of GST protein;

2: pGEX-SSCV-A;

3: pGEX-SSCV-B;

4: pGEX-SSCV-C;

5: pGEX-SSCV-D

2.5 GST-SSCV融合蛋白的纯化

表达菌诱导后其超声波裂解上清经用谷胱甘肽sepharose 4B RediPack亲和层析柱纯化后，四种嵌合蛋白均得到了纯化。SDS-PAGE分析结果如图2-5所示。

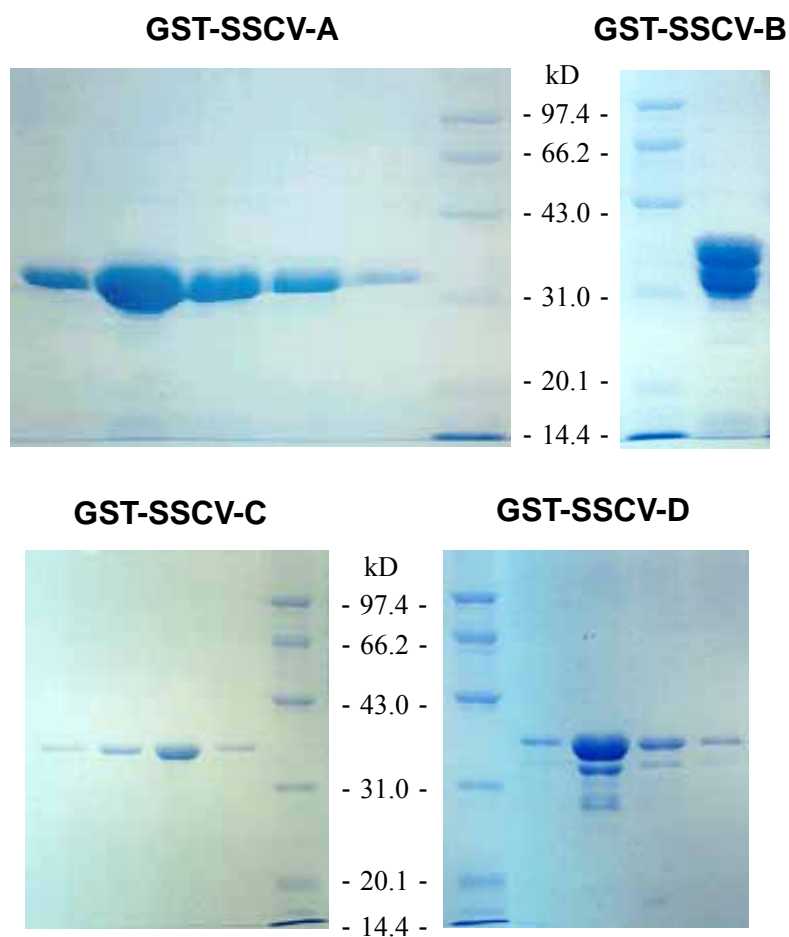


图2-5 纯化融合蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.2-5 SDS-PAGE analysis of the recombinant chimeric fusion protein.

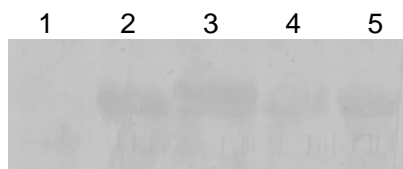


图2-6 融合蛋白的western-blot分析

Fig.2-6 The fusion protein could be recognized by sera measured by western blot analysis.

1:GST control protein; 2,3,4:fusion protein of GST-SSCV-A, GST-SSCV-B, GST-SSCV-C, GST-SSCV-D

2.6 融合蛋白的免疫反应性

如图2-6所示,抗SARS-CoV康复期患者血清可特异识别GST-SSCV融合蛋白,而不识别同样高效表达的载体所表达的GST蛋白,其中GST-SSCV-A, GST-SSCV-B和GST-SSCV-D能较好地被识别, GST-SSCV/C与SARS-CoV阳性血清反应较弱。

3 讨论

在抗原抗体反应中,抗原参与结合的部位称为抗原决定簇,即抗原表位(epitope),表位是蛋白质抗原性的基础。由于免疫学理论、基因工程、蛋白质工程的发展和固相多肽合成技术、生物物理技术、免疫检测技术以及计算机技术的广泛应用,使蛋白质抗原表位的研究方法和思维方法有了新的进展,发现了一些适应于蛋白质抗原表位研究的实验检测和理论预测方法。其中常用的参数有二级结构、亲水性、抗原性、表面可及性、灵活性等。Lasergene软件中的Protein模块包含这些参数,用Lasergene软件对SARS-CoV结构蛋白基因进行分析,选出了可能存在表位的抗原优势区域,为保持各区域结构的相对独立性,各区域间以非极性的甘氨酸和脯氨酸按G-P-G的形式间隔。嵌合基因经诱导后为分泌型表达,表明表达产物亲水性好。表达产物能被SARS康复患者血清特异识别,表明具有较好的免疫活性。实验结果表明计算机分析预测区域中包含抗原表位,这也有利于进一步筛选结构基因的抗原表位。计算机分析的结果与表位的实际分布情况是有区别的,其分析结果中可能包含非表位序列,还可能有些表位不在分析结果中,所以要对SARS-CoV结构基因进行表位作图还需对其它区域进行分析研究。

本次SARS流行以来,世界各国科学家都投入研究,至今已研制成功数种诊断方法,主要分为三类:以病毒培养为基础的生物学方法,以RT-PCR为基础的PCR方法,以抗原抗体反应为基础的免疫学方法。这些方法各有其优缺点,本研究通过计算机分析筛选并重组了SARS-CoV结构蛋白基因的主要抗原优势区域基因,构建成功了分泌型融合表达载体,表达产物可被SARS康复患者血清所识别,表明所选择的模拟表位中存在真实表位,在以后的实验中将对所选择模拟表位进行精确定位鉴定工作。

实验二 SARS 冠状病毒单克隆抗体的制备及表位鉴定

摘 要 SARS-CoV 的纤突蛋白 (Spike protein) 是病毒粒子的一种主要结构蛋白。它在介导病毒粒子与宿主细胞受体的结合以及诱导中和抗体中起重要作用。用表达并纯化了重组嵌合蛋白 GST-SSCV-D 和 GST-SSCV-A 为抗原制备了一系列单克隆抗体。抗 SSCV-D 的单抗有两株, 分别为 D3D1 和 D3C5。将 6 个 S 蛋白预测表位分别与 GST 融合表达。在这 6 个融合蛋白中 GST-S5 可以和单克隆抗体 D3C5 反应, GST-S2 可以和单抗 D3D1 反应。Western blot 分析表明两个单抗所识别的表位均为线性表位。两个表位分别位于 SARS-CoV 纤突蛋白的第 447 至 458 氨基酸残基和 789 至 799 氨基酸残基。D3D1 表位 (447~458) 正位于 S 蛋白与受体结合的结构域中。该研究可以为进一步分析 SARS-CoV 纤突蛋白功能以及防治 SARS 的研究提供基础。

关键词 严重急性呼吸系统综合征 (SARS), 纤突蛋白, 表位, 单克隆抗体

SARS 是新出现的一种传染性严重急性呼吸系统综合征 (Severe acute resperiratory syndrom, SARS), 其病原为一种新型冠状病毒变种 (Peiris 等, 2003a; Drosten 等, 2003; Ksiazek 等, 2003), 命名为 SARS 冠状病毒 (SARS Coronavirus, SARS-CoV)。

SARS-CoV 是一种带囊膜的单链正义 RNA 病毒。基因组全长约为 29.7Kb, 有 11 个开放阅读框, 基因组的组织形式类似于基因它的冠状病毒 (Qin ED 等, 2003)。基因组序列和氨基酸序列与其它动物冠状病毒比较同源性非常低 (Peiris 等, 2003a; Drosten 等, 2003; Qin ED 等, 2003)。尽管 SARS 发生后在野生动物体内分离出了基因序列高度同源的病毒, 但是这样的病毒在 2003 年以前从未从人或动物体内发现。基因序列的系统进化分析表明这种新的病毒不同于已知的 1、2、3 群冠状病毒中的任何一群, 它可能代表一个新的冠状病毒群 (Qin ED 等, 2003)。S 糖蛋白是冠状病毒表面的一种重要的结构蛋白, 它有很好的抗原性, 可以诱导机体产生保护性免疫反应, 并且在与宿主细胞受体的结合, 病毒细胞膜融合及病毒的入侵中起着重要的作用 (Gallagher 等, 2001)。在 SARS 冠状病毒的结构蛋白中, S 蛋白是主要的免疫保护性蛋白 (Buchholz 等, 2004)。因此在疫苗的设计中首先要了解 S 蛋白的结构与功能, 特别是对 S 蛋白进行表位鉴定是非常重要的。在本研究中运用生物信息学方法分析预测了 6 个 S 蛋白抗原表位, 构建了一个多表位嵌合基因并成功地进行了表达。以重组融合蛋白为抗原制备了两株抗 S 蛋白单克隆抗体, 并对两株单克隆抗体的抗原表位进行了精确的鉴定。本研究可为进一步了解 S 蛋白的结构与功能以及抗 SARS 疫苗的设计提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 单克隆抗体的制备

将纯化的嵌合蛋白 GST-D 和 GST-A 50 μ g 用弗氏完全佐剂乳化,经皮下多点注射免疫 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,以后每间隔两周再用弗氏不完全佐剂乳化的融合蛋白加强免疫两次,取脾细胞融合前三天分别用 25 μ g A 和 D 抗原经尾静脉加强免疫一次。融合前取正常小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养细胞,于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 24h,然后取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 细胞以 1:7 的比例在融合剂 PEG3000 的作用下进行细胞融合。融合后加入选择培养基 HAT 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱进行选择培养,约 7~10 天,当有融合细胞出现时,更换 HT 培养基继续培养。同时分别用融合表达的嵌合蛋白 GST-D 和 GST-A 作为检测抗原,对融合细胞的上清液进行间接 ELISA 检测以筛选阳性细胞克隆株。将经初步筛选得到的可疑阳性细胞克隆株用有限稀释法再进行 3~5 次单克隆纯化,并按常规方法制备小鼠腹水。

1.2 表达 S 蛋白预测表位寡核苷酸链的设计

为了分别表达 6 个 S 蛋白预测表位 S1、S2、S3、S4、S5 和 S6,设计了如表 3-1 所示的 6 对寡核苷酸链。每条多肽合成正负两条寡核苷酸链,相互配对,退火后在 5'端和 3'端分别形成 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点粘性末端。在多肽编码区之后紧接着为一终止子序列。

1.3 表达覆盖 S2 和 S5 的 9 氨基酸短肽系列的设计

为了对表位 S2 和 S5 进行精确鉴定,设计了两套分别覆盖 S2 和 S5 的 9 肽,即为 S2-1 至 S2-4 和 S5-1 至 S5-3,分别为 S2 系列和 S5 系列 9 肽,从 N 端至 C 端依次移动 1 氨基酸残基且覆盖 S2 和 S5 全长,其序列如表 1 所示。为了对这些 9 肽进行融合表达,每条 9 肽都对应设计了一对寡核苷酸链,序列如表 1 所示,在退火后在每条双链 DNA 的正向为 *Bam*HI 位点,反向为 *Xho*I 位点。

1.4 预测表位及 9 肽的融合表达

*Bam*HI, *Xho*I 双切质粒 pGEX-6P-1,琼脂糖凝胶电泳回收;将各寡核苷酸链对退火,将退火的 DNA 链与线性化的载体用 T4 DNA 连接酶连接过夜,转化大肠杆菌 DH5 α 。大肠杆菌感受态的制备,质粒的连接转化按常规方法进行。重组子经酶切鉴定后并经测序验证,阳性重组质粒转化表达宿主菌 BL21,挑取单菌落培养过夜后,按 1:100 接种于新鲜 2 \times YT 培养基中,继续培养至对数生长期,0.1mol/L IPTG 诱导 4h,培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬,超声波裂解后 12,000rpm 离心分离上清和沉淀;12%凝胶 SDS-PAGE 电泳检测表达情况;超声波裂解物上清用谷胱甘肽 sepharose 4B RediPack 亲和层析柱 (Pharmacia Biotech) 纯化。

表3-1 合成的寡核苷酸序列及编码的多肽序列
Table 3-1. The sequence of peptides and the synthesized nucleotides.

编号	合成寡核苷酸序列	氨基酸序列及起始位置
S1	5'- <i>gatcca</i> aactactaggaacattgatgctacttcaactggttaattataatt taac -3'	NTRNIDATSTGNYN (424-437)
S2	5'- <i>gatcca</i> agcttaggcccttgagagagacatatctaattgt taac -3'	KLRPFERDISNV (447-458)
S2-1	5'- <i>gatcca</i> agcttaggcccttgagagagacata taac -3'	KLRPFERDI (447-455)
S2-2	5'- <i>gatccc</i> ttaggcccttgagagagacatatct taac -3'	LRPFERDIS (448-456)
S2-3	5'- <i>gatcc</i> aggcccttgagagagacatatctaatt taac -3'	RPFERDISN (449-457)
S2-4	5'- <i>gatccc</i> cttgagagagacatatctaattgt taac -3'	PFERDISNV (450-458)
S3	5'- <i>gatcc</i> gattccgttcgagatcctaaacatctgaaatattat taac -3'	DSVRDPKTSEIL (560-571)
S4	5'- <i>gatcc</i> gctgaacaggatcgcaacacacgtgaagtgtt taac -3'	AEQDRNTREVF (754-764)
S5	5'- <i>gatccc</i> ctgaccctctaaagccaactaagaggtcttt taac -3'	PDPLKPTKRSF (789-799)
S5-1	5'- <i>gatccc</i> ctgaccctctaaagccaactaagag taac -3'	PDPLKPTKR (789-797)
S5-2	5'- <i>gatcc</i> gaccctctaaagccaactaagaggtct taac -3'	DPLKPTKRS (790-798)
S5-3	5'- <i>gatccc</i> ctctaaagccaactaagaggtcttt taac -3'	PLKPTKRSF (791-799)
S6	5'- <i>gatcc</i> aaaaatcatacatcaccagatgttgatcttggcgacatttc taac -3'	KNHTSPDVDLGDIS (1139-1152)

注：表中所示序列均为正链序列。在每条正义链的 5'和 3'端分别有一 *gatcc* 和 *c* 序列（斜体所示），相应地在负义链的 3'和 5'端分别有一 *g* 和 *gagct* 序列（负链序列未列出）。当将正负义链退火时，两条链相互配对并在分别在 5'端和 3'端形成 *Bam*HI 和 *Xho*I 粘性末端。在第条多肽编码序列之后有一附加的 *taa* 终止子序列（粗体所示）。

1.5 酶联免疫吸附试验（ELISA）

用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（pH 9.6）将纯化的蛋白稀释成 10μg/ml 或超声裂解物上清液进行 50 倍稀释，以 100μl/孔包被 ELISA 板 4℃ 过夜，用 5% 脱脂乳室温封闭 3h。封闭后用 PBST（PBS 含 0.1% Tween-20）洗三遍，加入杂交瘤培养上清液或适当稀释的腹水，37℃ 作用 1h，PBST 洗五遍；加入 1：5000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体，37℃ 作用 1h，PBST 洗七遍，加入 OPD 显色液显色 15 分钟，50μl/孔 2mol/L H₂SO₄ 终止，490 nm 波长测量吸收值。

1.6 免疫印迹试验 (Western blot)

细菌裂解物离心后上清液与等体积 $2\times$ 上样缓冲液混合,经 12%分离胶 SDS-PAGE 电泳分离后转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂乳 4°C 封闭过夜。与适当稀释的一抗 37°C 作用 1h, PBST 洗三次,每次 10 分钟;1:5000 稀释的二抗 37°C 作用 1h, PBST 洗三次,每次 10 分钟;用 DAB 显色或 BCIP/NBT 显色系统进行显色。

2 结果

2.1 预测表位及 9 肽融合蛋白的表达

编码预测表位多肽及 S2、要 S5 序列的正负义寡核苷酸链退火物与经 *Bam*HI,*Xho*I 双切处理的载体 pGEX-6P-1 连接转化后,经酶切鉴定及最终序列测定鉴定,均得到了阳性重组质粒。重组质粒转化表达宿主菌 BL21 后经 0.1mmol/L IPTG 诱导均表达与预期值大小相符的特异型蛋白带,各表位融合蛋白大小为 26~27kD,表达融合蛋白均存在于表达菌体超声裂解后的上清中(图 3-4A, 3-6A, 3-6C)。

2.2 重组多表位融合蛋白 GST-D 与 SARS 患者康复期血清及免疫鸡血清免疫印迹检测结果

免疫印迹检测结果显示,表达的多表位重组融合蛋白 GST-D 能被 SARS 患者康复期血清和免疫鸡血清特异性地识别,并且与免疫鸡血清反应为强阳性,如图 3-1A 所示。结果显示表达的重组蛋白具有免疫反应活性。提示所预测的抗原表位中含有真实的抗原表位。

2.3 预测表位融合蛋白 GST-S2 和 GST-S5 与 SARS 患者康复期血清及免疫鸡血清免疫印迹检测结果

与 SARS 患者康复期血清及免疫鸡血清免疫印迹检测结果显示,GST-S1 至 GST-S6 6 个重组预测表位融合蛋白中,GST-S2 能与免疫鸡血清发生反应,与 SARS 患者康复期血清也有弱反应,如图 3-1B 所示。结果提示 S2 是一个抗原表位。

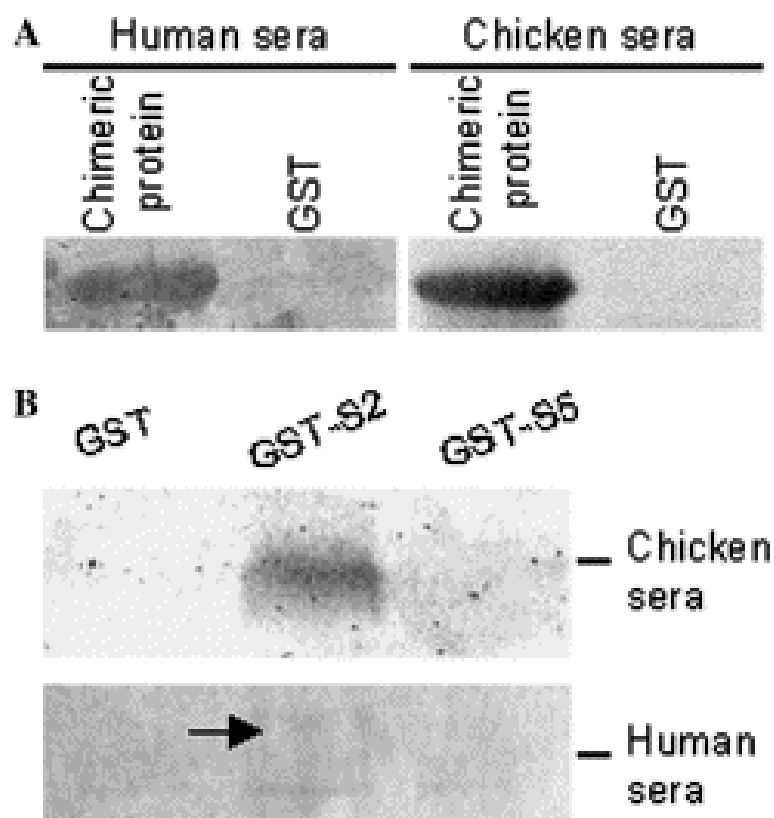


图 3-1 重组融合蛋白的免疫印迹分析

Fig.3-1 Western blot analysis of the recombinant protein.

A 多表位嵌合蛋白与 SARS 患者康复期血清及免疫鸡血清免疫印迹检测结果；

B 预测表位融合蛋白与 SARS 患者康复期血清及免疫鸡血清免疫印迹检测结果

2.4 单克隆抗体的制备与鉴定

用纯化的多表位嵌合蛋白免疫 BALB/c 小鼠，经细胞融合和 ELISA 筛选、纯化后共得到了 6 株能稳定分泌特异性抗体的阳性杂交瘤细胞，SSCV-D 特异的有两株：D3D1、D3C5（图 3-2）。对得到的 2 株单克隆抗体进行亚型鉴定，结果 D3C5 为 IgG2a 外，D3D1 为 IgG1，而轻链均为 κ 链（表 3-2）。用商品化的 SARS-CoV ELISA 试剂盒检测制备的腹水，单抗 D3C5 和试剂盒提供的阳性血清与试剂盒反应 OD 值均大于 0.5，呈阳性，而 D3D1 反应较弱，介于阳性血清与阴性血清反应值之间。用经灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 对单抗 D3D1 进行 Western blot 分析，结果发现在约 180kD 处出现一条特异的反应带（图 3-3）。

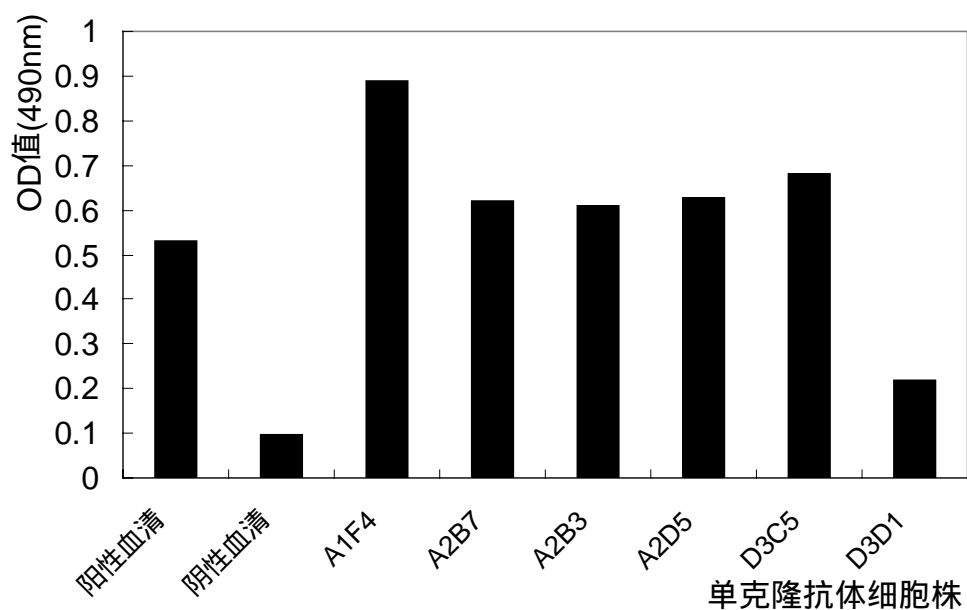


图3-2 SARS-CoV ELISA对6株单克隆抗体细胞株腹水特异性检测

Fig.3-2 Specificity of six monoclonal antibodies detected by SARS-CoV ELISA

表3-2 SARS-CoV合成表位单克隆抗体亚型的鉴定

Table 3-2 Characteristic the subtype of the MAbs.

类别	单抗细胞株					
	A1F4	A2B3	A2B7	A2D5	D3D1	D3C5
抗体类型	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a
轻链类型	Kappa	Kappa	Kappa	Kappa	Kappa	Kappa

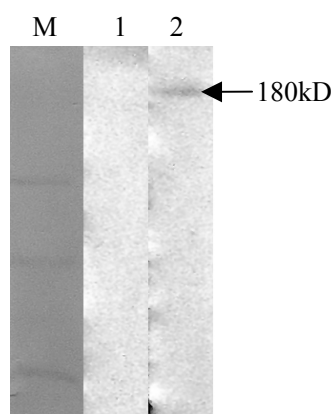


图 3-3：单抗 D3D1 与灭活和超声波裂解后的 SARS-CoV 的 Western blot 分析

Fig. 3-3 Western blot analysis of MAb D3D1 to SARS-CoV.

M：为蛋白分子量 marker,大小依次为 97.4、66.2、43kD；1：为未接 SARS-CoV 的 VeroE6 细胞对照；2：为灭活的经 VeroE6 细胞培养的 SARS-CoV 超声波裂解物。

2.5 单克隆抗体的表位鉴定

用单克隆抗体 D3D1 和 D3C5 对预测表位融合蛋白进行 Western blot 和 ELISA 检测，结果显示 GST-S2 能被单抗 D3D1 特异性地识别，如图 3-4B (Western blot) 和图 3-5A (ELISA)，相应的表位命名为 S2，对应的多肽序列为 KLRPFERDISNV (447~458AA)。单抗 D3C5 能特异性地识别 GST-S5，如图 3-4C (Western blot) 和图 3-5C (ELISA)，相应的表位命名为 S5，对应的多肽序列为 PDPLKPTKRSF (789~799AA)。

2.6 单克隆抗体表位的精确定位

S2 及 S2 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3D1 的 ELISA (图 3-5B) 和 Western blot (图 3-6B) 结果显示，S2-1 是表位 S2 的核心序列，即为 KLRPFERDI (447~455AA)。S5 及 S5 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3C5 的 ELISA (图 3-5D) 和 Western blot (图 3-6D) 结果显示，S5-1 是表位 S5 的核心序列，为 PDPLKPTKR (789~797AA)。

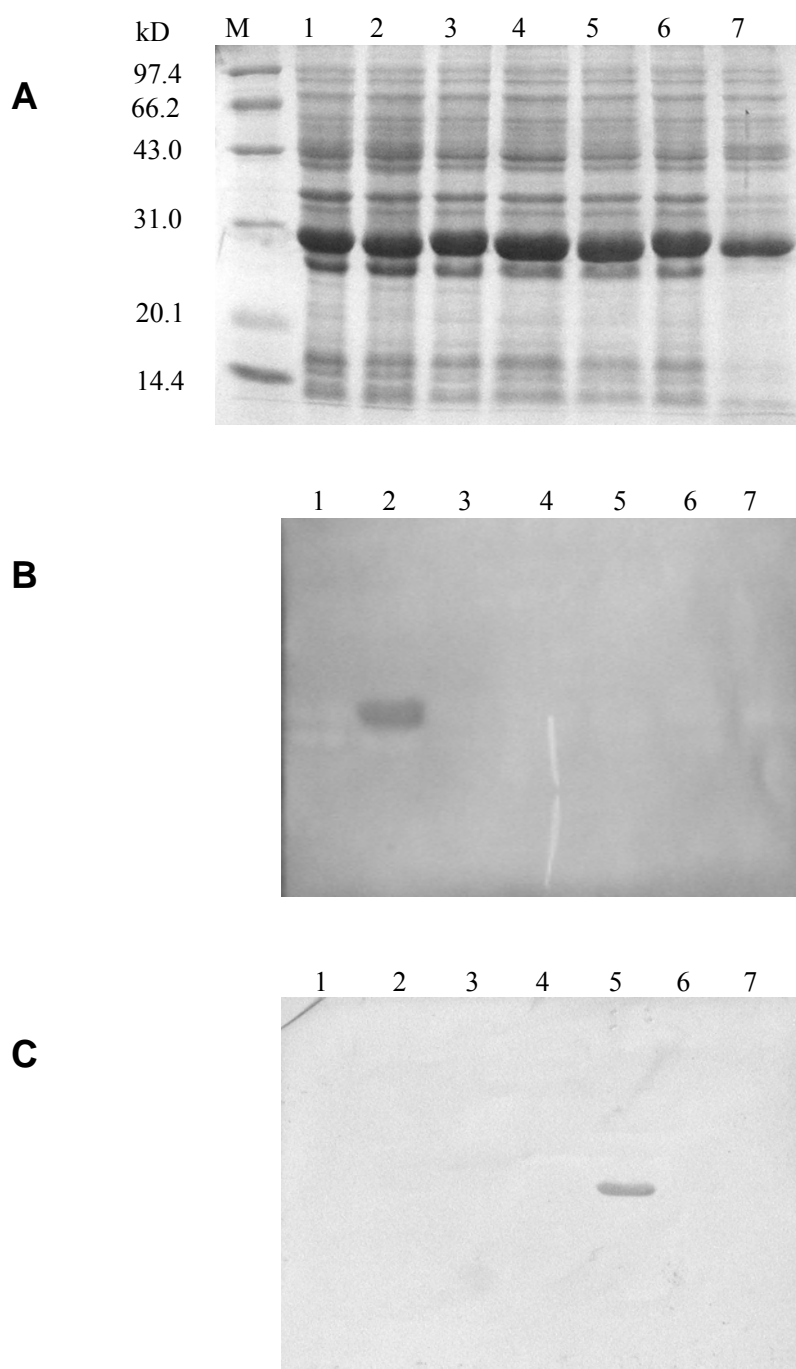


图 3-4 预测表位融合蛋白与单克隆抗体的 Western blot 分析结果

Fig.3-4 Western blot analysis results of recombinant peptide-fusion protein to MAbs.

(A) 预测表位融合蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 为蛋白质分子量标准, 1-6 依次为 GST-S1、GST-S2、GST-S3、GST-S4、GST-S5、GST-S6, 7 为 GST 对照; (B) 预测表位融合蛋白与单抗 D3D1 的 Western blot 分析 编号 1-7 顺序同图 A; (C) 预测表位融合蛋白与单抗 D3C5 的 Western blot 分析 编号 1-7 顺序同图 A

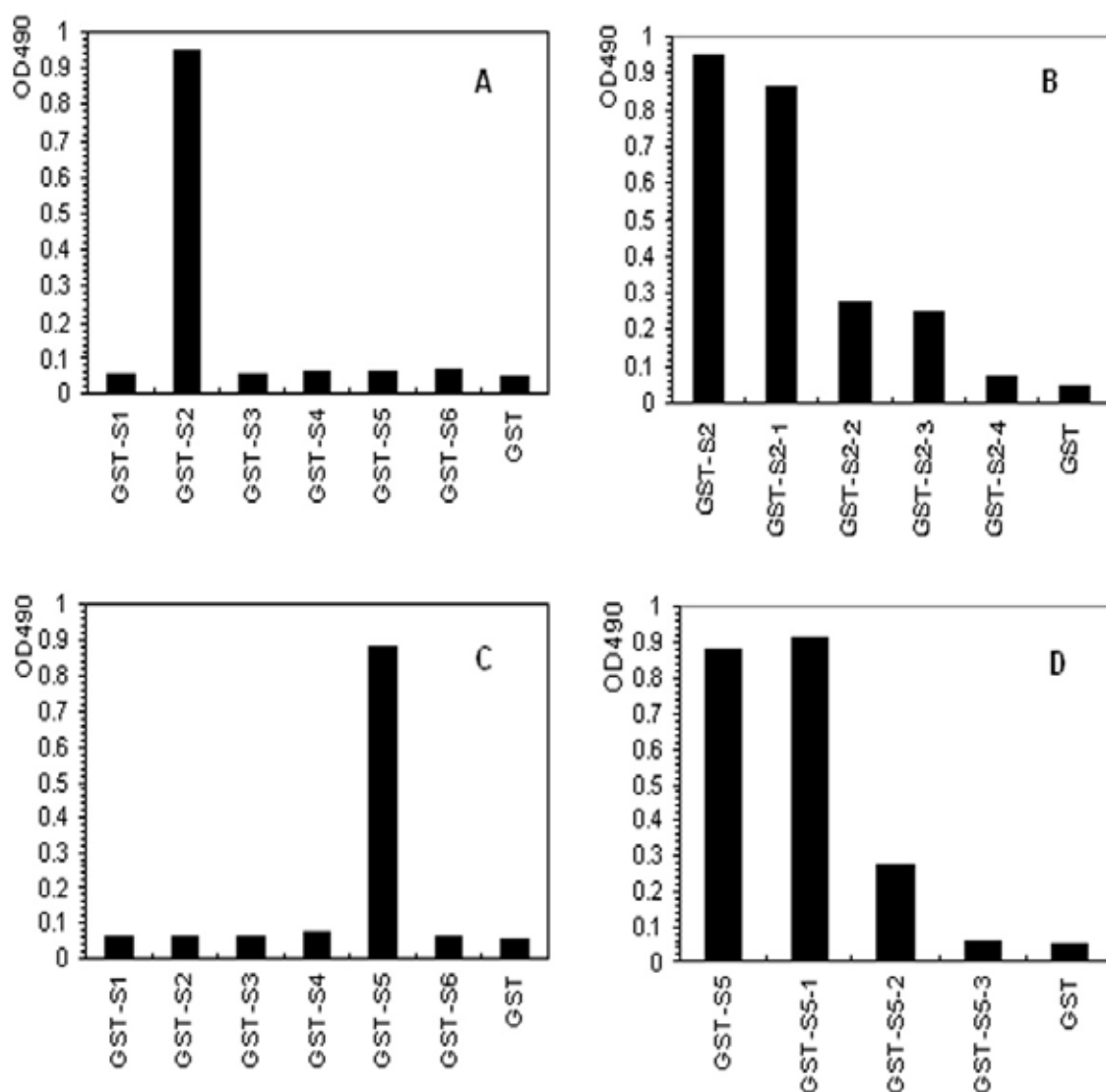


图 3-5 预测表位融合蛋白与单克隆抗体的 ELISA 检测结果

Fig.3-5 ELISA results of peptide fused protein to MAbs.

(A) 预测表位融合蛋白 GST-S1 至 GST-S6 以及 GST 与单抗 D3D1ELISA 结果 ;(B) S2 及 S2 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3D1 ELISA 结果 ;(C) 预测表位融合蛋白 GST-S1 至 GST-S6 以及 GST 与单抗 D3C5 ELISA 结果 ;(D) S5 及 S5 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3C5 ELISA 结果

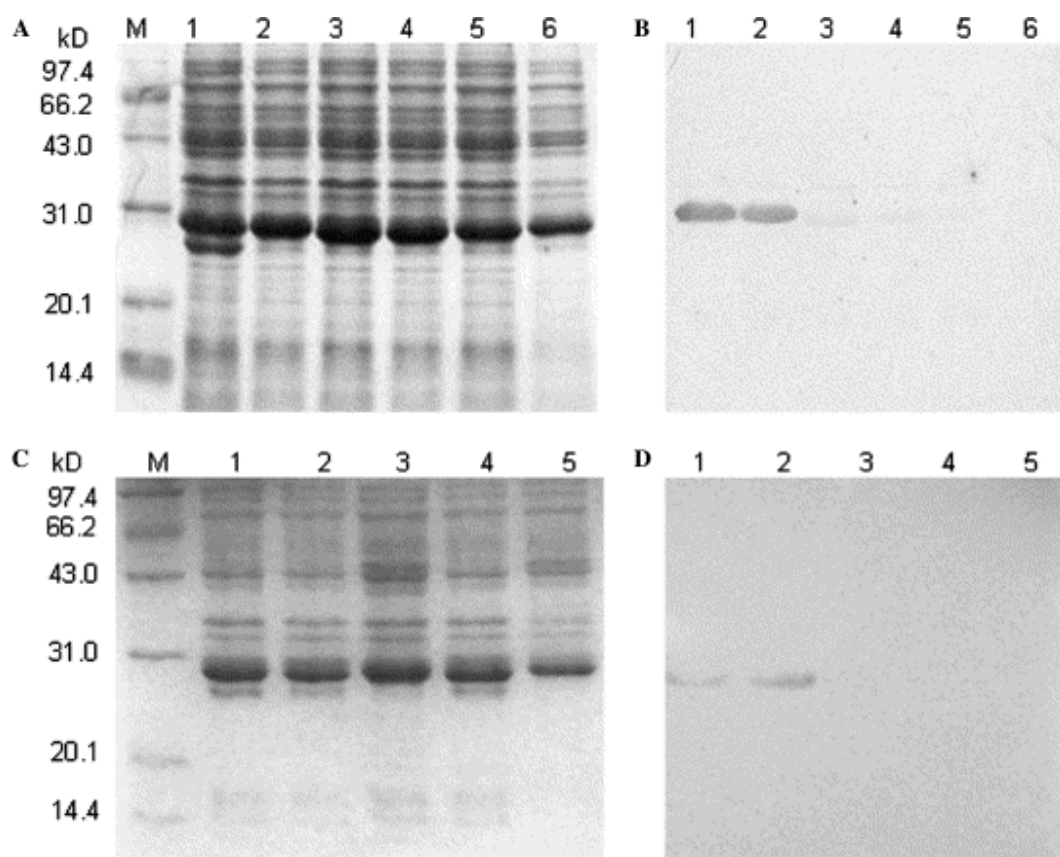


图 3-6 表位 S2 和 S5 精确定位的 Western blot 分析结果。

Fig.3-6 Precise location of epitopes with Western blot.

(A) S2 及 S2 系列 9 肽融合蛋白的 SDS-PAGE 分析结果 M 为蛋白质分子量标准, 1-6 分别为 GST-S2、GST-S2-1、GST-S2-2、GST-S2-3、GST-S2-4、GST ; (B) S2 及 S2 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3D1 Western blot 结果, 1-6 上样顺序同图 A 中 1-6 ; (C) S5 及 S5 系列 9 肽融合蛋白的 SDS-PAGE 分析结果 M 为蛋白质分子量标准, 1-5 分别为 GST-S5、GST-S5-1、GST-S5-2、GST-S5-3、GST ; (D) S5 及 S5 系列 9 肽融合蛋白与单抗 D3C5 Western blot 结果, 1-5 上样顺序同图 C 中 1-5

3 讨论

抗原表位 (epitope) 也称抗原决定簇, 是抗原分子上具有刺激机体产生抗体或致敏 T 淋巴细胞并能够与抗体或细胞识别的部位。根据抗原受体细胞的不同可抗原表位可分为 B 细胞表位和 T 细胞表位, 分别在机体的体液免疫和细胞免疫中起重要作用; 根据表位组成氨基酸的连续性可分为线性表位的构象表位; 根据表位在抗原分子上的暴露与否可分为隐蔽性表位和暴露性表位; 根据对病原有无中和作用可分为中和表位和非中和表位。抗原表位的鉴定分析对了解抗原物质的结构与功能, 设计基于表位的安全有效的疫苗以及开发基于表位的诊断试剂有重要意义。尽管抗原物质的 B 细胞表位通常大部分是构象表位, 仅有一小部分为线性表位。本实验中多表位融合蛋白

与 SARS 康复血清以及免疫鸡血清的免疫印迹结果表明所预测的表位中含有真实的表位。并且利用单克隆抗体进一步鉴定出了抗原表位 S2 和 S5，它们均为线性表位。表位 S2 能被 SARS 康复血清的免疫鸡血清识别，表明两种血清中均有表位 S2 特异的抗体，也提示表位 S2 是暴露在 S 蛋白表面。表位 S2 的核心序列为 K₄₄₇LRPFERDI₄₅₅AA，表位 S5 的核心序列为 P₇₈₉DPLKPTKR₇₉₇（图 3-7）。研究表明 S 蛋白的第 318~510 位氨基酸残基长为 193 氨基酸残基的片段是与 SARS-CoV 受体 ACE2 结合的部分（Wong 等，2004），表位 S2 正好位于该受体结合结构域中。

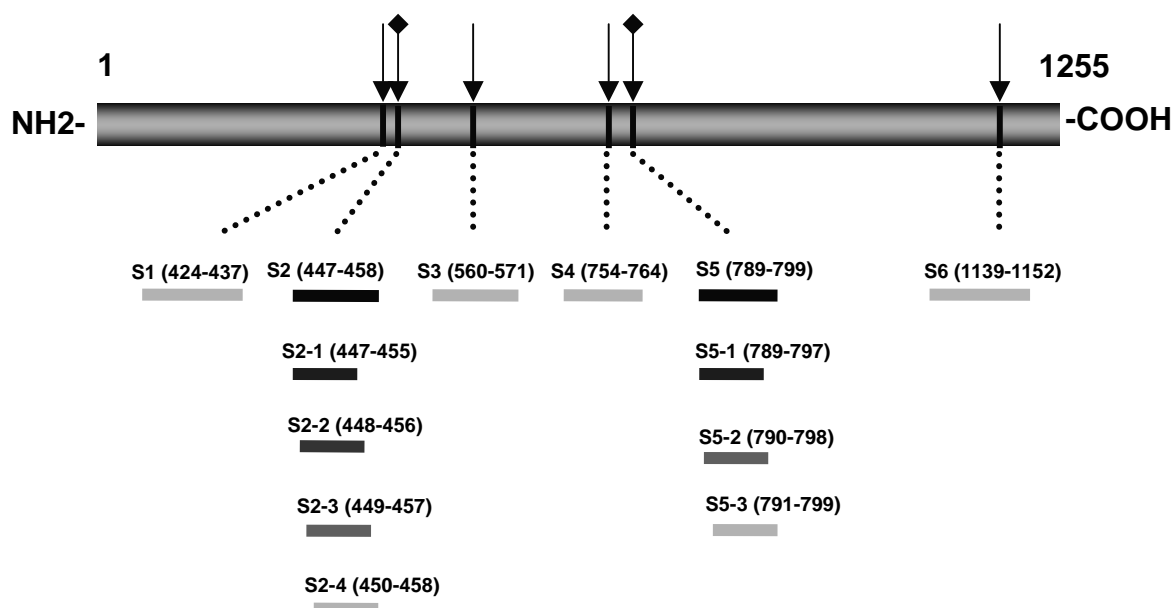


图 3-7. 表位鉴定结果示意图

Fig.3-7 Schematic diagram of spike protein epitopes identification results.

SARS-CoV 是一种新出现的冠状病毒，从最先发现分离此病毒至今，世界各国的科研人员已测定了数十株病毒的全基因组序列。在病毒的病原学，免疫及病毒大分子结构与功能的研究上均取得了重要进展。但是 SARS 是一种新出现的传染病，要完全控制该病还有许多研究工作要做。本研究对 SARS-CoV S 蛋白抗原表位进行了初步分析，构建并表达了多表位重组融合蛋白，制备了抗 S 蛋白单克隆抗体，鉴定了两个 S 蛋白抗原表位，为进一步分析 S 蛋白结构与功能以及对抗 SARS 疫苗的设计提供了一定的基础。

实验三 SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体 2C5 识别表位的鉴定

摘 要 以SARS-CoV S蛋白单克隆抗体2C5为筛选靶分子,筛选噬菌体展示随机7肽库。经三轮淘洗后挑选20个噬菌体克隆进行ELISA分析和序列测定。在10个ELISA OD值大于0.2的阳性噬菌体克隆中,有8个噬菌体克隆展示有共同的7肽序列TPEQQFT。展示有该序列的噬菌体克隆能竞争抑制SARS-CoV S蛋白抗原与单抗2C5的结合。与SARS-CoV S蛋白序列比对分析发现该7肽序列散布于S蛋白的第539位到第559位氨基酸上。将S蛋白T₅₃₉PSSKRFQPFQQFGRDVSDFT₅₅₉的21肽与GST进行融合表达,得到了可溶解的融合蛋白。该融合蛋白能不能被单抗2C5识别,但经 Western blot 分析表明该融合蛋白能被灭活 SARS 冠状病毒免疫鸡血清识别。表明 T₅₃₉PSSKRFQPFQQFGRDVSDFT₅₅₉是S蛋白的一个线性表位,而TPEQQFT为单克隆抗体2C5的模拟表位。

关键词 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV), S 蛋白, 单克隆抗体, 噬菌体展示随机肽库, 表位

SARS 冠状病毒的 S 蛋白是病毒粒子表面一种重要的结构蛋白。负责与宿主细胞受体相结合,决定了病毒的细胞嗜性。S 蛋白具有良好的免疫原性,可诱导机体产生病毒中和抗体,在机体的免疫保护中发挥重要作用,是设计研究 SARS 疫苗的候选靶标。SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体的制备,特别是中和性单克隆抗体制备,对 SARS 的治疗和诊断具有重要意义,而且已经有数个实验室在从事单克隆抗体的制备工作。对 S 蛋白结构与功能的研究方面,抗原表位的鉴定是一项重要的工作,特别是对中和性抗原表位的鉴定,将有助于 SARS 基因工程疫苗的设计研究。

用噬菌体随机肽库筛选抗原表位是抗原表位鉴定中常用的一种方法。该方法不仅可以鉴定线性抗原表位,而且可以得到其它方法很难鉴定的蛋白抗原构象表位的模拟表位。本研究以单克隆抗体 2C5 为靶分子,用噬菌体展示的 7 肽随机肽库进行淘洗,以鉴定单抗 2C5 的表位。以期为进一步研究 S 蛋白的结构与功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 噬菌体随机肽库、菌株和单克隆抗体

噬菌体随机 7 肽库 ph.D.C7C 购自 New England Biolabs 公司,库容量为 1.2×10^9 。大肠杆菌 ER2378 为本实验室保存。SARS-CoV S 蛋白单克隆抗体 2C5 为哈尔滨兽医研究所吴东来研究员提供,此单克隆抗体具有病毒中和活性。

1.2 其它试剂与材料

克隆表达与纯化的质粒载体和试剂同实验一所述。真核表达 SARS 冠状病毒 S 蛋白抗为哈尔滨兽医研究所步志高研究员提供。抗噬菌体 M13 抗体为 promeg 公司产品。

1.3 主要试剂的配制

封闭液：称取 5g 脱脂奶粉溶于 100ml 0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.6) 中。

阻断液：0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.6) , 5mg/ml BSA , 0.02% NaN_3 , 过滤除菌 , 4°C 保存。

TBS：50mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) , 150mmol/L NaCl , 高压灭菌 , 室温储存。

洗涤液(TBS/T)：每 100ml TBS (pH 7.5) 可加入 0.5ml Tween-20。

洗脱液：量取 862 μl 浓盐酸至 50ml 重蒸水中 , 用甘氨酸调节 pH 值至 2.2 , 定容至 100ml。

LB培养基：每升含：10 g Bacto-Tryptone , 5 g yeast extract , 5 g NaCl。灭菌后室温保存。

IPTG/Xgal：将 1.25 g IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 和 1 g Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 溶解于 25 ml 二甲基甲酰胺。
-20°C 避光保存。

LB/IPTG/Xgal：平板 LB 液体培养基+ 15 g/L。灭菌后冷至 70°C 加 1 ml IPTG/Xgal 摇匀后倒板。4°C 保存备用。

上层琼脂：每升含 10 g Bacto-Tryptone , 5 g yeast extract , 5 g NaCl , 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7 g 琼脂糖。高压灭菌后分装室温放置备用 , 用前微波炉融化。

四环素贮液：用酒精配成 20 mg/ml , -20°C 避光保存 , 用前摇匀。

LB-Tet平板：LB液体培养基+ 15 g/L琼脂 , 灭菌后冷至 70°C 加 1 ml 四环素贮液摇匀后倒板 , 于 4°C 避光保存 , 如变黑或变棕色则弃之不用。

PEG/NaCl溶液：20% (w/v) PEG8000 , 2.5 mol/L NaCl。高压灭菌后室温放置。

1.4 噬菌体的滴定

噬菌体的滴定按肽库试剂盒说明书进行操作。主要过程如下：从大肠杆菌 ER2378 平板上挑一个单菌落 , 接种于 5~10ml LB 培养基中 , 于 37°C 振荡培养至对数生长期 (OD_{600} 约为 0.5)。细菌长好后将上层琼脂在微波炉中加热融化后于 50°C 水浴中备用。用 LB 培养基将待滴定的噬菌体进行 10 倍系列稀释。每个稀释度取 10 μl 加入到分装有 200 μl 细菌培养物中 , 混匀后室温感作 5min。将感作好的混合液全部转入上层琼脂中 , 迅速混匀后到入 LB/Tet/IPTG/X-Gal 平板上 , 摇动平板使琼脂平铺于平板上层。室温放置 5min , 37°C 过夜培养。计数蓝色噬斑 , 计算噬菌体的噬斑形成单位。

1.5 噬菌体肽库的亲和筛选（参照说明书进行，简述如下）

第一天

- a. 将单克隆抗体2C5以10 μ g/ml溶解在0.1mol/L NaHCO₃ (pH8.6)。
- b. 取150 μ l上述抗体溶液加入至96孔板中，轻轻混匀，使孔底完全浸满液体。
- c. 将板置于湿盒中，于4 $^{\circ}$ C包被过夜。

第二天

- d. 接种ER2378单个克隆至20ml LB培养液中，于250ml三角烧瓶中剧烈振荡培养。
- e. 将包被孔中包被液倒掉，置于干燥灭菌的吸水纸上拍干，弃尽残余的液体。用封闭液加满孔，将ELISA板孔放于湿盒中于4 $^{\circ}$ C中放置2h。
- f. 如步骤e弃尽封闭液。尽快用TBST液振荡洗涤ELISA板孔，倒掉甩干，在干净的纸巾上拍干 残留液体。如此反复洗涤5次。立即进入淘选过程，注意不要让孔干燥。
- g. 用100 μ l TBST将噬菌体肽库稀释至 2×10^{11} 个噬菌体，加入至板孔中，置于封闭、湿润的盒中，室温振荡摇动60min。
- h. 弃去未结合的噬菌体，在洁净的吸水纸上拍干。
- i. 如步骤f用TBST将板孔冲洗10次，注意每一次都要更换一块干净的纸巾，以防交叉污染。
- j. 往冲洗后的板孔中加入100 μ l洗脱液，室温轻轻摇动15min；将洗脱液吸入一个无菌的eppendorf管中，立即加入15 μ l的1mol/L Tris.HCl (pH9.1)。中和洗脱液，混匀后溶液的pH值在7~8.5之间。
- k. 取1 μ l洗脱下的噬菌体按照上文所述方法进行滴定噬菌斑形成单位。
- l. 剩余的噬菌体洗脱液按如下程序进行扩增：先取洗脱获得的噬菌体溶液加入新鲜制备的培养至对数生长早期的ER2378细菌中混合，让噬菌体感染细胞，室温作用5min。然后将混合物吸入到37 $^{\circ}$ C预热的20ml含四环素（0.2 μ g/ml）培养基中，37 $^{\circ}$ C剧烈振荡培养4.5h。
- m. 将培养液倒入一个灭菌的离心管中，4 $^{\circ}$ C，1000g离心10min，将上清转移入另外一个管中，再于10,000g离心10min。
- n. 取80%上清至另一个新的离心管中，加入1/6体积的PEG/NaCl，上下颠倒10次混匀内容物，冰上放置或者冰箱中保存至少4h或过夜。

第三天

- o. 4 $^{\circ}$ C10000g离心15min，沉淀噬菌体。弃去上清，再度离心，将上清去除干净。

- p. 将沉淀溶解在1ml TBS中。反复吹吸溶解沉淀后，转移到一个1.5ml的eppendorf管中，简单振荡，12000g离心1min沉淀不溶物质。
- q. 将上清转移到另一个新的eppendorf管中，加入1/6体积的PEG/NaCl，充分混合（上下颠倒100次），于冰上再度沉淀噬菌体15~60min。4℃ 12000g离心10min，去除上清后，再离心，用吸头吸弃残余的液体。
- r. 将沉淀溶解在200ul TBS中，振荡，溶解后继续离心10min以沉淀不溶性物质。上清转移到一个新的eppendorf管中，获得扩增了的洗脱噬菌体。
- s. 按照上文所述方法进行滴定噬菌体。
- t. 再用单克隆抗体如同前面的方法进行包被96孔板，每孔150μl，按a~c进行。

第四天和第五天

- u. 计算蓝斑数目，获得噬菌体的滴度。根据洗脱噬菌体扩增后的数目决定下一轮投入噬菌体的量。每次输入噬菌体的数目不得低于 10^7 pfu。
- v. 进行第二轮筛选，用第一轮洗脱扩增获得的噬菌体作为投入噬菌体，重复步骤d~r，提高洗脱液中Tween-20的浓度至0.2%（v/v）。
- w. 在LB/IPTG/X-Gal平板上滴定第二轮洗脱扩增的噬菌体。
- x. 再用单克隆抗体2C5包被ELISA板孔，进入第三轮筛选，按照 第一天的步骤a~c进行。

第六天

- y. 执行第三轮筛选程序，加入第二轮筛选洗脱后扩增的噬菌体，重复步骤d~k。同样提高洗脱液中Tween-20的浓度至0.5%。
- z. 在LB/IPTG/X-Gal平板上滴定互相间扩增的第三轮筛选获得的噬菌体。如果进行第三轮筛选后仍需进行第四、五轮的筛选，噬菌体文库仍需要扩增。

1.6 筛选噬菌体的克隆和扩增

在第三轮筛选后洗脱噬菌体滴定板中，选择噬菌斑少于100个的平板，从该平板中用灭菌的吸头随机挑取20个单个噬斑，每挑取一个噬斑换一个吸头。加入到装有100倍稀释的过夜培养的ER2738的试管中，一个克隆一个试管。于37℃剧烈振荡培养4.5h。后将培养物到离心管中，离心30sec。上清转移到新的eppendorf管中，再离心。吸取80%上清至一个新的离心管中，即为扩增后的噬菌体，可以在4℃保存数周，如长期保存可以按1:1加入灭菌甘油，-20℃保存。这

些噬菌体克隆依次命名为 2C5P1、2C5P2 至 2C5P20。

1.7 噬菌体序列的测定

将挑取的 20 个噬菌体制备单链噬菌体 DNA, 进行序列测定分析。单链 DNA 模板的制备按以下步骤进行: 将 1.4 中扩增的噬菌体各取 500 μ l 于新的离心管中, 每管中加入 200 μ l PEG/NaCl, 混合后室温静置 10min, 12,000g 离心 10min, 沉淀溶于 100 μ l 碘化钠缓冲液, 再向其中加入 250 μ l 无水乙醇, 室温静置 10min, 12,000g 离心 10min 弃尽上清, 用 70%乙醇洗沉淀一次, 用 30 μ l 来菌去离子水将沉淀悬起, 即可作为噬菌体测序模板。测序引物为 M13-96g111 引物, 序列为: 5'-GCCCTCATAGTTAGCGTAGCT-3'。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.8 噬菌体 ELISA

将单克隆抗体 2C5 用包被液稀释成 10 μ g/ml, 按每孔 100 μ l 加入 96 孔 ELISA 板中, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用洗液 (TBST, 0.5%Tween-20) 洗涤 3 次后, 加入封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, 洗涤 3 次。将纯化的噬菌体用 TBS 稀释成 10^{12} pfu/ml, 取 100 μ l 加入到每孔中, 每个样品重复 3 孔; 室温感作 2h 后, 用洗液洗涤 5 次, 每孔加入 100 μ l 1:5000 稀释的 HRP-鼠抗 M13 噬菌体抗体 (Pharmacia), 37 $^{\circ}$ C 感作 1h; 用洗液洗涤 5 次; OPD 显色 20min 后, 用 2mol/L H₂SO₄ 终止, 于。

1.9 噬菌体竞争抑制 ELISA

用真核表达 SARS 冠状 S 蛋白包被 ELISA 板, 约 1 μ g/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 TBS 将纯化的噬菌体 2C5EP14 10 倍梯度稀释, 使其浓度依次为 2×10^{12} , 2×10^{11} , 至 2×10^4 。各取 50 μ l 与等体积适当稀释的单抗 2C5 混合, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h。感作后加入 ELISA 孔中, 每孔重复三次。37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤后加入 5000 倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤后用 OPD 显色, 测定 492nm OD 值

1.10 多肽的融合表达与融合蛋白的纯化

为了与 GST 融合表达单抗 2C5 可能识别的 S 蛋白表位, 序列为 TPSSKRFQPFQFGRDVSDF 的 21 肽。设计了两条寡核苷酸, 正链 S539~559s 序列为: 5'-gATCCACTCCTTCTTCAAAGAgATT TCAACCATTTCACAATTTggCCgTgATgTTTCTgATTCTACTC-3'; 负链 S539~559a 序列为: 5'-TCgAgAgTgAAATCAgAAACATCACggCCAAATTgTTgAAATggTTgAAATCTCTTTgAAgAAgg AgTg-3。正负链为互补链, 退火后中间为编码 21 肽序列, 正向末端为 BamHI 位点, 反向末端为 XhoI 位点。退火后的双链 DNA 与用 BamHI 和 XhoI 线性化的载体 pGEX-6p-1 (Invitrogen) 连接。转化大肠杆菌 DH5 α , 酶切鉴定重组质粒, 阳性质粒送上海博亚生物技术有限公司测序列以验证序列的正确性, 阳性重组质粒命名为 pGEX-S539。阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。IPTG 诱导后 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达。融合蛋白按前文所述方法用谷胱甘肽 Sepharose 4B RediPack (Amersham Pharmacia Biotech) 柱亲和层板纯化, 重组融合蛋白命名为 GST-S539。

1.11 融合蛋白与单克隆抗体 2C5 的 ELISA 分析

方法与上文所述 ELISA 相同。包被抗原为纯化融合蛋白 GST-S539，浓度为 50 μ g/ml。包被相同浓度的 GST 蛋白为对照。一抗为 2C5。

1.12 融合蛋白与鸡抗 SARS 冠状病毒血清的 Western blot 分析

诱导样品经 12%凝胶 SDS-PAGE 电泳后，转印至硝酸纤维素膜上，5%脱脂乳 4 封闭过夜，TTBS 洗三遍，浸入 1:100 稀释的鸡抗 SARS 阳性血清中，室温作用 2h，TTBS 洗三遍后浸入 1:5000 稀释的 AP 标记羊抗鸡 IgG 抗体，室温作用 1h，洗涤三次后用 BCIP/NBT 显色系统显色。

2. 结果

2.1 噬菌体肽库的筛选

为了证明噬菌体肽库筛选系统的有效性，在三次淘洗过程中，通过不断提高洗涤液中 Tween-20 的浓度而逐渐严格洗涤条件，经三轮“吸附-洗脱-扩增”副集筛选后，测定噬菌体的输入与收获率，结果如表 4-1 所示。结果表明经每一轮筛选后，噬菌体都得到了富集。滴定洗脱后噬菌体在平板中的蓝斑如图 4-1 所示。

表 4-1 噬菌体肽库的筛选

Table 4-1 Bio-Panning with the peptide library.

	第一轮筛选	第二轮筛选	第三轮筛选
	1 st screening	2 nd screening	3 rd screening
输入噬菌体(Input)	2×10^{10} pfu	5×10^8 pfu	5×10^8 pfu
洗脱噬菌体(Output)	1.7×10^5 pfu	3.7×10^5 pfu	1.9×10^7 pfu
洗脱/输入(Out/In)	$8.5 \times 10^{-4}\%$	0.074%	3.8%



图 4-1 噬菌体噬斑

Fig.4-1 Plaque of phages.

2.2 噬菌体的克隆与结合分析

挑取第三轮筛选后洗脱物中的 20 个噬斑克隆，并扩增纯化得到了 20 个噬菌体克隆。用单克隆抗体 2C5 包被 ELISA 板后，检测 20 个噬菌体克隆与单抗的结合能力。结果表明，OD 值大于 0.2 的有 10 个，OD 值大于 0.25 的有 8 个噬菌体克隆（图 4-2）。表明经三轮筛选后，噬菌体随机肽库得到了很好的富集，并且这种富集作用很特异。

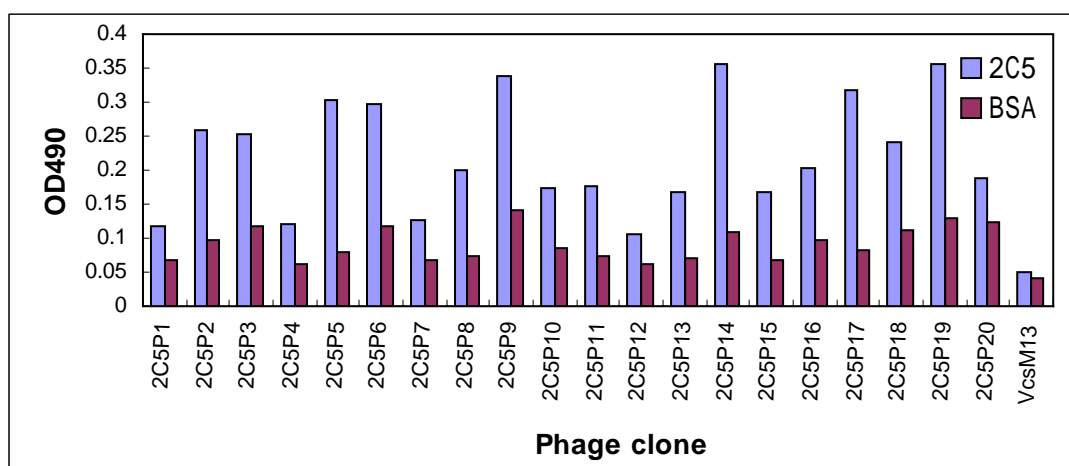


图 4-2 噬菌体与单克隆抗体 2C5 的 ELISA 结合分析

Fig.4-1 ELISA analysis the binding ability of diluted phages clone to MAb 2C5.

2.3 噬菌体展示序列的测定与分析

经序列测定表明,在第三轮洗脱物中随机挑选的 20 个克隆中,其展示的 7 肽序列有 8 个是一致的,为 TPEQQFT。而且这 8 个克隆与单抗 2C5 的结合能力最好,其 ELISA OD 值均大于 0.25 (表 4-2),测序列结果与 ELISA 结果有很高的一致性,表明序列 TPEQQFT 为单克隆抗体 2C5 的模拟抗原表位。为进一步分析 S 蛋白中 2C5 表位的结构,将 TPEQQFT7 肽序列与 S 蛋白全长序列进行比对分析。结果发现 7 肽序列 TPEQQFT 分散于 S 蛋白第 539 至 559 氨基酸残基序列间(图 4-3)。可能 539~559 片段即为单抗 2C5 的连续表位序列。

表 4-2 噬菌体序列测定结果

Table 4-2 Sequence analysis of selected.

Phage clone No.	OD490	DNA sequence	AA sequence
2c5p1	0.119	ACGAAGTCTCCTCCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p2	0.258	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p3	0.253	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p4	0.121	ACGAAGTCTCCTCCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p5	0.302	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p6	0.298	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p7	0.127	ACGAAGTCTCCTCCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p8	0.200	ACGAAGTCTCCTCCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p9	0.338	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p10	0.173	ACTCCTTCGGCGCTTGCGAGT	TPSALAS
2c5p11	0.176	TCTTGCCCTAATACGAGTAAT	SWPNTSN
2c5p12	0.107	ACGTCGCTGCTGAGGGGGCAG	TSLLRGQ
2c5p13	0.168	CCTCCGATGCCGAATACGACG	PPMPNTT
2c5p14	0.357	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p15	0.167	ACTCCTTCGGCGCTTGCGAGT	TPSALAS
2c5p16	0.203	TCTTGCCCTAATACGAGTAAT	SWPNTSN
2c5p17	0.318	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p18	0.242	CATGCTACGCATACGAATTAT	HATHNTY
2c5p19	0.355	ACGCCTGAGCAGCAGTTTACT	TPEQQFT
2c5p20	0.187	ACTCCTTCGGCGCTTGCGAGT	TPSALAS

*OD490 在 0.25 以上有 8 (2,3,5,6,9,14,17,19)个:全为:TPEQQFT; OD490 在 0.2 以上的有 10 个:8 个:TPEQQFT;(16): SWPNTSN;
(18): HATHNTY

Bj01	K N Q C V N F N F N G L T G T G V L T P S S K R F Q P F Q Q F G R D V S D F T D	560
2c5p-2	- - - - - T P E - - - - - Q Q F - - - - - T	7
Bj01	K N Q C V N F N F N G L T G T G V L T P S S K R F Q P F Q Q F G R D V S D F T D	560
2c5p-2	- - - - - T P E - - - - - Q Q - - - - - F T	7
Bj01	K N Q C V N F N F N G L T G T G V L T P S S K R F Q P F Q Q F G R D V S D F T D	560
2c5p-2	- - - - - T P E Q Q F T - - - - -	7

图 4-3 噬菌体展示肽序列与 S 蛋白序列的比对分析

Fig.4-3 Sequence alignment between the peptide displayed on the phage and S protein of SARS-CoV of BJ01 strain.

2.4 噬菌体的竞争 ELISA

经序列测定分析以及与单抗 2C5 的 ELISA 分析表明，经三轮筛选后得到了一致的展示 7 肽序列。为了进一步验证该序列为 S 蛋白表位的可能性，分析了展示有该 7 肽序列的噬菌体克隆 2C5P14 对单抗 2C5 与 S 蛋白抗原结合的抑制效果。结果表明，噬菌体 2C5p14 对 S 蛋白抗原具有竞争抑制作用，当噬菌体数量为 10^{11} pfu/孔时几乎能完全抑制 2C5 与 S 蛋白的结合（图 4-4）。

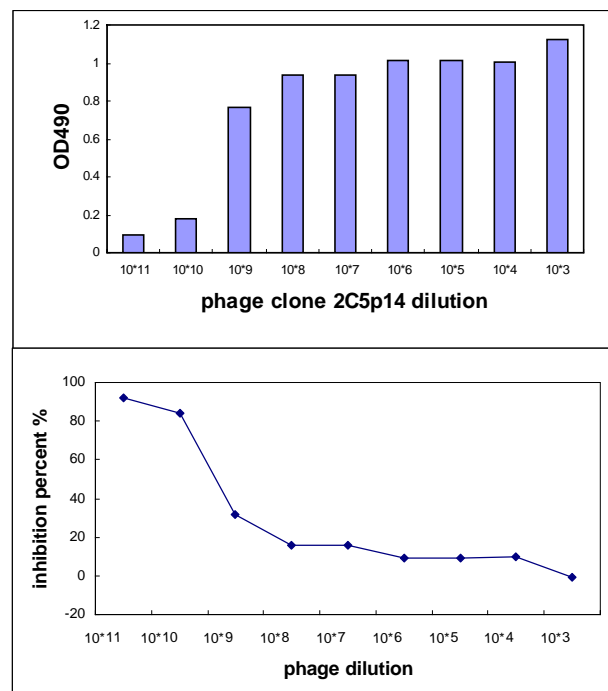


图 4-4 噬菌体的竞争抑制 ELISA

Fig.4-4 Competitive inhibition ELISA of selected phage.

2.5 短肽的融合表达与纯化

为了验证 S539~559 是否为单抗 2C5 的表位序列,将编码 S 蛋白第 539~559 氨基酸残基片段多肽序列的正负义寡核苷酸链退火物与经 *Bam*HI,*Xho*I 双切处理的载体 pGEX-6P-1 连接转化后,经酶切鉴定及最终序列测定鉴定,均得到了阳性重组质粒。重组质粒转化表达宿主菌 BL21 后经 0.1mmol/L IPTG 诱导后重组蛋白 GST-S539 得到了表达,表达融合蛋白存在于表达菌体超声裂解后的上清中。经亲和层析纯化获得了纯化的融合蛋白(图 4-5)。

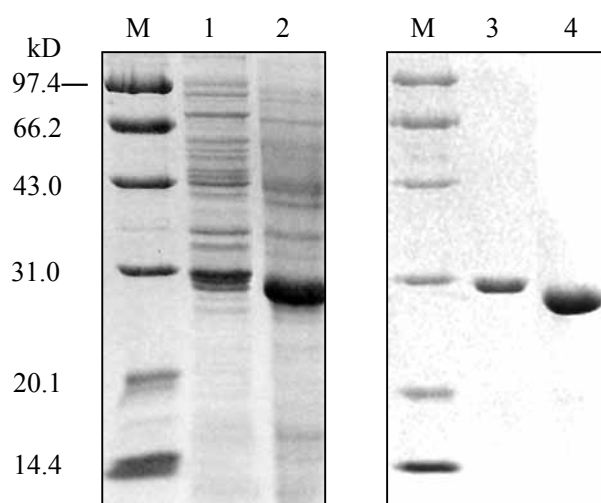


图 4-5 短肽融合蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.4-5 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of recombinant fusion protein.

M, 中分子量蛋白质标准; 1, 诱 GST-S539 导表达; 2, GST 诱导表达; 3, 纯化的 GST-S539; 4, 纯化的 GST

2.6 融合蛋白的免疫反应性

经 ELISA 分析,融合蛋白 GST-S539 不能与单克隆抗体 2C5 结合,2C5 同样不与 GST 结合(图 4-6A);而 Western blot 结果显示,融合蛋白 GST-2C5EP1 能被鸡抗 SARS 冠状病毒血清所识别,而 GST 对照则不能被识别(图 4-6B)。从以上的结果可以看出 S 蛋白 539-559 片段是 S 蛋白的一个线性抗原表位,但不是单抗 2C5 的表位。

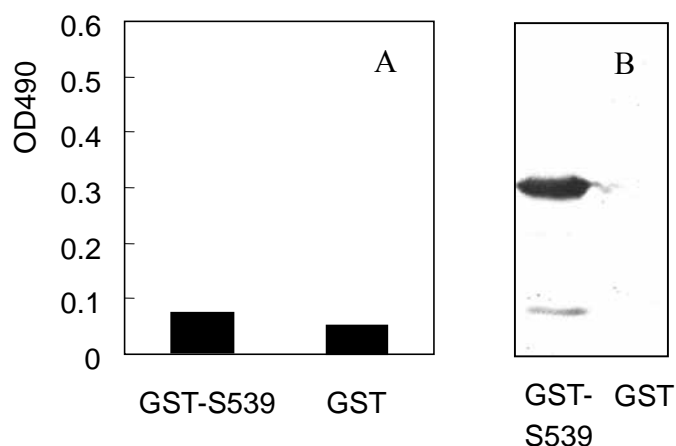


图 4-6 融合蛋白与单克隆抗体 2C5 的 ELISA(A)和与免疫鸡血清的 Western blot (B)

Fig.4-6 ELISA (A) Result of fusion protein to MAb2C5 and Western blot (B) of fusion protein to chicken sera against SARS-CoV.

3 讨论

Smith (1985) 年首次报道运用基因工程方法可将外源性多肽序列与丝状噬菌体 fd 的外壳蛋白融合表达并展示在噬菌体表面, 随后又证明展示于噬菌体表面的多肽能够被特异性抗体所识别 (Parmley & Smith, 1988)。噬菌体展示使表达的多肽以融合蛋白形式展现在噬菌体表面, 保持相对独立的空间结构和生物活性, 并且可用免疫学亲和纯化方法筛选, 因此噬菌体展示是一种筛选靶蛋白和多肽的强有力方法。该技术可用于研究多肽或蛋白质的性质、相互识别和作用, 能从巨大展示肽库中选择特定功能的多肽结构。噬菌体表面展示技术广泛用于蛋白质相互作用的研究、新型疫苗的研制、药物的开发及诊断试剂制备、抗原表位的鉴定、特异性调节分子的分离、细胞表面工程的研究等方面 (Stoute 等, 1995; Hou 等, 2002; Dell'Orco 等, 2002; Cerino 等, 2001)。

将人工合成的随机排列的寡核苷酸插入丝状噬菌体 *pIII* 或 *pVIII* 基因的信号肽和成熟蛋白编码区之间, 经转导后插入 DNA 片段以融合蛋白形式表达并装配在噬菌体表面, 这些表达不同短肽 (代表不同序列) 的重组噬菌体构成噬菌体展示肽库。筛选则采用亲和纯化 (affinity purification), 称之为生物淘洗 (biopanning), 类似于淘金 (panning)。其过程是, 先将重组噬菌体与受体作用, 除去非特异结合的噬菌体, 然后将特异性结合的噬菌体洗脱下来经扩增、克隆后进行序列测定和活性分析。在本实验中, 以单克隆抗体 2C5 为靶, 用噬菌体展示的随机七肽库进行淘洗, 经三轮淘洗后得到了一致的序列 TPEQQFT。此序列与 S 蛋白进行序列对比后, 发现可能是散在于 S539~559 间。进一步融合表达了 S539~559 多肽, 结果发现此多肽确为 S 蛋白的一个线性表位, 但是与单抗 2C5 的回归免疫学反应表明它不是 2C5 的表位。但展示有此序列的噬菌克隆对单抗 2C5 与

S蛋白抗原间的ELISA反应确有竞争抑制作用,表明此序列为单抗2C5的一个模拟表位。进一步对单抗2C5进行特性分析,Westerb blot分析发现它对细胞培养全病毒,S蛋白S1区及其截短的片段的原核表达产物均不识别,这也表明它对应的表位不是一个线性表位,极可能是一个空间构象性表位。

对单克隆抗体2C5的特性分析的新报道也印证了本文的结果(He等,2005;Chou等,2005),在他们的报告中报道了单抗2C5的中和活性,以及进一步明确了它对应的表位是一个构象性表位。它具有抑制S蛋白受体结合结构域与细胞受体ACE2结合的作用,表明此构象表位位于SRBD结构域上。一般而言,对构象表位进行精确的序列与位点鉴定是很困难的,而绝大多数抗原表位特别是中和性抗原表位都是构象性的。本实验中通过噬菌体展示肽库筛选得到了一个2C5的模拟表位,此模拟表位具有对2C5与S蛋白抗原的竞争抑制作用,此结果在进一步对S蛋白结构与功能的研究和SARS疫苗的设计研究中可能会有一定的参考意义。

实验四 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 部分的表达与免疫性分析

摘 要 SARS 冠状病毒 S 蛋白 S1 部分在与细胞受体结合以及诱导机体产生保护性中和抗体中发挥重要作用。用 PCR 扩增 S1 及 S1N, S1C 和 SRBD 四个片段。PCR 产物分别克隆到表达载体 pGEX-6p-1 中, 经诱导各融合蛋白均以包涵体形式表达。Western blot 分析表明融合蛋白均能被单克隆抗体 D3D1 和鸡抗 SARS 冠状病毒血清识别。融合蛋白包涵体变性溶解后与鸡抗 SARS 冠状病毒血清 ELISA 分析结果也显示良好的免疫反应性。与鸡抗 SARS 冠状病毒血清的 ELISA 和 Western blot 结果均表明位于 S 蛋白 510~672 氨基酸残基片段是 S1 蛋白中的免疫优势决定区。该结果可为进一步分析 S 蛋白结构与免疫学特性提供基础。

关键词 SARS 冠状病毒, S 蛋白, 免疫优势决定区

严重急性呼吸系统综合征 (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 年发生在我国广东地区, 在 2002~2003 年的流行暴发期间, 世界范围内有 8000 余人感染并导致 800 余人死亡。该病的病源是一种新型的冠状病毒, 即 SARS 冠状病毒。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和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。SARS 冠状病毒 S 蛋白长 1255AA, 是结构蛋白区编码的最大的蛋白质, 其中 12~672AA 是 S 蛋白的 S1 部分, 该结构域能与细胞受体结合。本研究克隆表达了 S1 片段及 S1N, S1C 和 SRBD 三个截短的片段, 并分析比较了表达产物与 SARS 康复病人血清及免疫鸡血清的免疫反应性。

SARS 冠状病毒 S 蛋白由两个结构域组成, 靠近 N 端的部分形成一个球状结构域, 靠近 C 端的部分形成一个穿膜的棒状结构。对已知的冠状病毒的研究已经证明, S 蛋白在病毒入侵细胞、病毒与细胞受体结合以及决定病毒的细胞嗜性方面发挥重要作用。目前一般认为 SARS-CoV S 蛋白不被切割成的 S1 和 S2 两个部分, 但比较其序列结构与功能仍将其分为 S1 和 S2 两个部分。其中 S1 形成成熟蛋白的球状部分, S2 形成成熟蛋白的棒状分, 包括一个 N helix, 一个 M helix, 一个 C Helix 和一个穿膜部分。S1 和 S2 之间通过分子间作用力相互结合。S2 的穿膜部分把整个 S 蛋白固定在病毒外壳膜上。北京大学医学部生物信息中心对 SARS 冠状病毒基因组编码的可能蛋白进行了序列分析与结构预测, 发现整个蛋白中可能有一个球状结构域, 提示可能为 S 蛋白的 S1 部分。穿膜区预测则发现在 1197~1218 氨基酸间有一段穿膜序列, 推测可能就是 S 蛋白和病毒外壳膜结合的位置。通过对二级结构的预测发现, 在约 729~770, 879~1016, 1164~1185 外分别有一个 Helix 区域, 提示可能为 S2 中的 N/M/C helix, 与病毒外壳膜 和宿主细胞膜的融合有关。N 端 1~13 位氨基酸可能为信号肽序列 (芮伟等, 2003)。YU 等(2003)分析发现 SARS 冠状病毒 S 蛋白有两个疏水区, 与以氨基肽酶 N (Aminopeptidase N, APN) /CD13 分子为细胞受体的冠状

病毒血清 1 群人呼吸道冠状病毒和猪传染性胃肠炎病毒 S 糖蛋白相似, 其中一个在整个蛋白的 N 端并且带有一个 1 型信号肽序列, 另外一个 C 端包含一个穿膜区和一个位于膜内的富含半胱氨酸尾。通过生物信息学蛋白质相互作用分析和分子建模分析, 发现 SARS 冠状病毒 S 蛋白中由第 757~761 氨基酸残基组成的结构域可与 CD13 分子中第 585~653 残基结构域相互作用, 推测 CD13 分子可能是 SARS 冠状病毒的受体, 与 SARS 病毒的感染相关(Bosch 等, 2004)。事实上 S 蛋白与受体结合的结构域在 S1 上, 其核心序列为一个 193 氨基酸残基片段 (Li 等, 2003)。

本实验对 S1 及其它三个截短片段进行了表达, 并分析了它们的免疫特性。对进一步开展 S1 区的抗原表位鉴定及建立免疫诊断方法有一定意义。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种及 SARS 基因

质粒 pGEX-6P-1、大肠杆菌 Dh5a 及 BL21 均为本实验室保存。含 SARS 冠状病毒 S1 基因的质粒 pBLUT-SS 由哈尔滨兽医研究所步志高研究员提供。

1.2 血清、抗体及试剂

限制性内切酶 *Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI, T4 DNA 连接酶为大连宝生物公司产品; IPTG, HRP 标记抗人 IgG, AP 标记抗鸡 IgG 均为 Promega 产品; 凝胶回收试剂盒为华舜生物公司产品。SARS 康复病人血清由华南农业大学廖明博士和张桂红博士惠赠, 灭活 SARS 冠状病毒免疫鸡血清由哈尔滨兽医研究所 SARS 研究小组提供。SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体 D3D1、D3C5 由本研究小组制备, 见第三章。

1.3 S1、S1N、S1C 及 SRBD 基因片段的 PCR 扩增

参照已发表的 SARS 冠状病毒 Urbani 株基因组序列 (NCBI 序列号: AY278741), 设计四条引物, 引物序列及在 S 基因中位置如表 5-1 所示。在正向引物的 5'端引入 *Bam*HI 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。PCR 反应体系为: dH₂O 33μl, 10×PCR buffer 5μl, 25p mol/L 上下游引物各 1μl, 25mmol/L dNTP 4μl, 模板 DNA 5μl, Ex-Taq DNA 聚合酶 1μl, 总体积 50μl。扩增各片段所使用的上下游引物分别为: S1 (pS1s, pS1a), S1N (pS1s, pSRBDa), S1C (pSRBDs, pS1a), SRBD (pSRBDs, pSRBDa)。PCR 反应条件为: 94 4min, (94 30sec, 55 1min, 72 2min) 循环 35 次, 72 5min, 4 保存。

表 5-1 PCR 引物序列

Table 1. PCR primers sequence.

引物编号	引物序列	起始/终止位置	方向
pS1s	5' ATAGGATCCAGTGGTAGTGACCTTGACCG 3'	34	+
pSRBDs	5' CGCGGATCCAATATTACAAACTTGTGTCC 3'	952	+
pSRBDa	5' TAACTCGAGAACCGTGGCCGGTGCATTTA 3'	1530	-
pS1a	5' CGCCTCGAGTTTTTGGCTAGTACTACGTAA 3'	2016	-

*序列中斜体带下划线部分为引入的限制性内切酶位点

1.4 S1、S1N、S1C 及 SRBD 片段表达质粒的构建

*Bam*HI, *Xho*I 双切质粒 pGEX-6P-1, 回收大片段; *Bam*HI, *Xho*I 双切 PCR 产物,回收相应片段,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 DH5 α ,重组子经酶切鉴定后命名为 pGEX-S1, pGEX-S1N, pGEX-S1C, pGEX-SRBD, 酶切鉴定阳性质粒送博亚生物技术有限公司测序。最后再将重组质粒转化感受态大肠杆菌 BL21 以备诱导表达。大肠杆菌感受态细胞的制备,质粒的连接转化按前文所述方法进行。

1.5 重组质粒的诱导表达

将表达菌种接种于含 100ug/ml 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 \times YT 培养基中,继续培养至对数生长期 ($A_{600} = 0.5\sim 0.7$),0.5mol/L IPTG 诱导 4h,培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬,超声波裂解后 12,000rpm 离心分离上清和沉淀;SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

1.6 表达产物的 Western blot 分析

样品经 SDS-PAGE 电泳后,转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂乳 4℃ 封闭过夜,TTBS 洗三遍,浸入 1:100 稀释的 SARS 康复病人血清或免疫鸡血清中,室温作用 2h,TTBS 洗三遍后浸入 1:5000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体或 1:5000 稀释的 AP 标记羊抗鸡 IgG,室温作用 1h,洗

涤三次后用 DAB 显色或 BCIP/NBT 显色系统进行显色。

1.7 表达产物的 ELISA 分析

诱导表达的包涵体蛋白经反复离洗涤三遍后,用 1/100 原培养液体积的 8mol/L 尿素变性液溶解。用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将变性溶解包涵体蛋白 100 倍稀释,以 100 μ l/孔包被 ELISA 板,空载体诱导上清包被对照孔,4 $^{\circ}$ C 过夜,用 5% 脱脂乳室温封闭 3h。封闭后用 PBST (PBS 含 0.1% Tween-20) 洗三遍,加入 100 倍稀释的鸡抗 SARS 冠状病毒血清,37 $^{\circ}$ C 作用 1h, PBST 洗五遍;加入 1:5000 稀释的 AP 标记羊抗鸡 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 作用 1h, PBST 洗七遍,加入碱性磷酸酶底物液显色 15 分钟,50 μ l/孔 2mol/L NaOH 终止,405 nm 波长测量 OD 值。

2 结果

2.1 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检查均出现与预期大小一致的目的条带(图 5-1)。S1 片段长为 2001bp, S1N 片段长为 1512bp, S1C 片段长为 1083bp, SRBD 片段长为 597bp。

2.2 重组质粒的构建与鉴定

重组质粒经 *Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI 酶切鉴定均得到了预期结果的阳性重组子。阳性重组质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双切均得到了与插入片段相同大小的片段(图 5-2)。阳性重组质粒送博亚生物技术公司测序。测序结果表明各片段序列重复区序列完全一致,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。

2.3 重组质粒的诱导表达

四个阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21 后,经 0.5mol/L IPTG 诱导 4h 后均得到了表达,表达产物大小与预期一致,GST-S1 约为 99.6kD, GST-S1N 约为 82.3kD, GST-S1C 约为 65.2kD, GST-SRBD 约为 47kD;表达的融合蛋白均以包涵体形式存在,如图 5-3 所示,箭头所示为表达的融合蛋白条带。

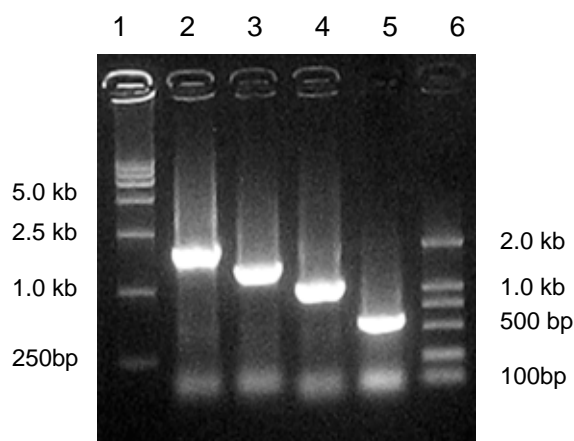


图 5-1 四个基因片段的 PCR 扩增

Table 5-1. PCR product of four fragments.

1、6 DNA 分子量标准；2 S1 PCR 产物；3 S1N PCR 产物；4 S1C PCR 产物；5 S1RBD PCR 产物；

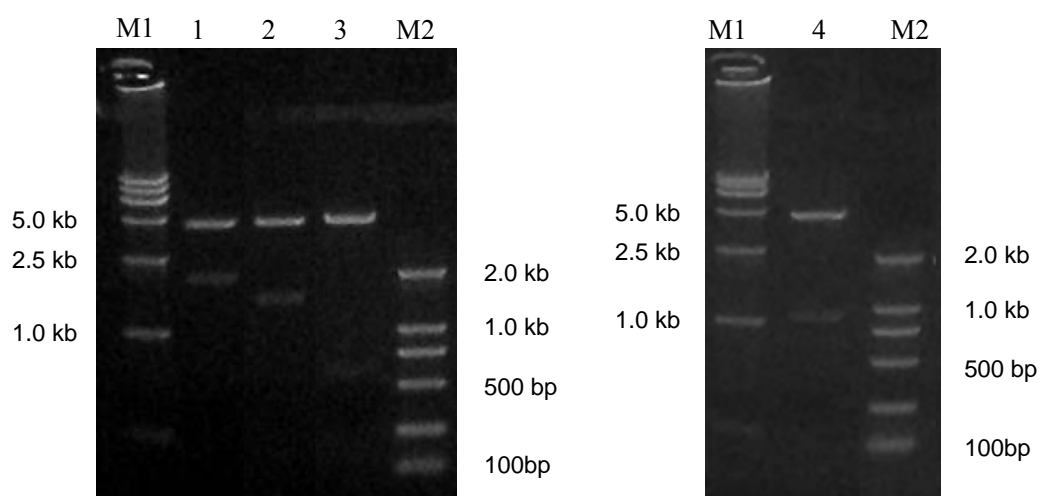


图 5-2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.5-2 Constructs identification with restriction enzyme digestion.

M1, DNA 分子标准(250~20,000bp); M2, DNA 分子标准(100~2,000bp); 1, 重组质粒 pGEX-S1; 2, 重组质粒 pGEX-S1N; 3, 重组质粒 pGEX-SRBD; 4, 重组质粒 pGEX-S1C

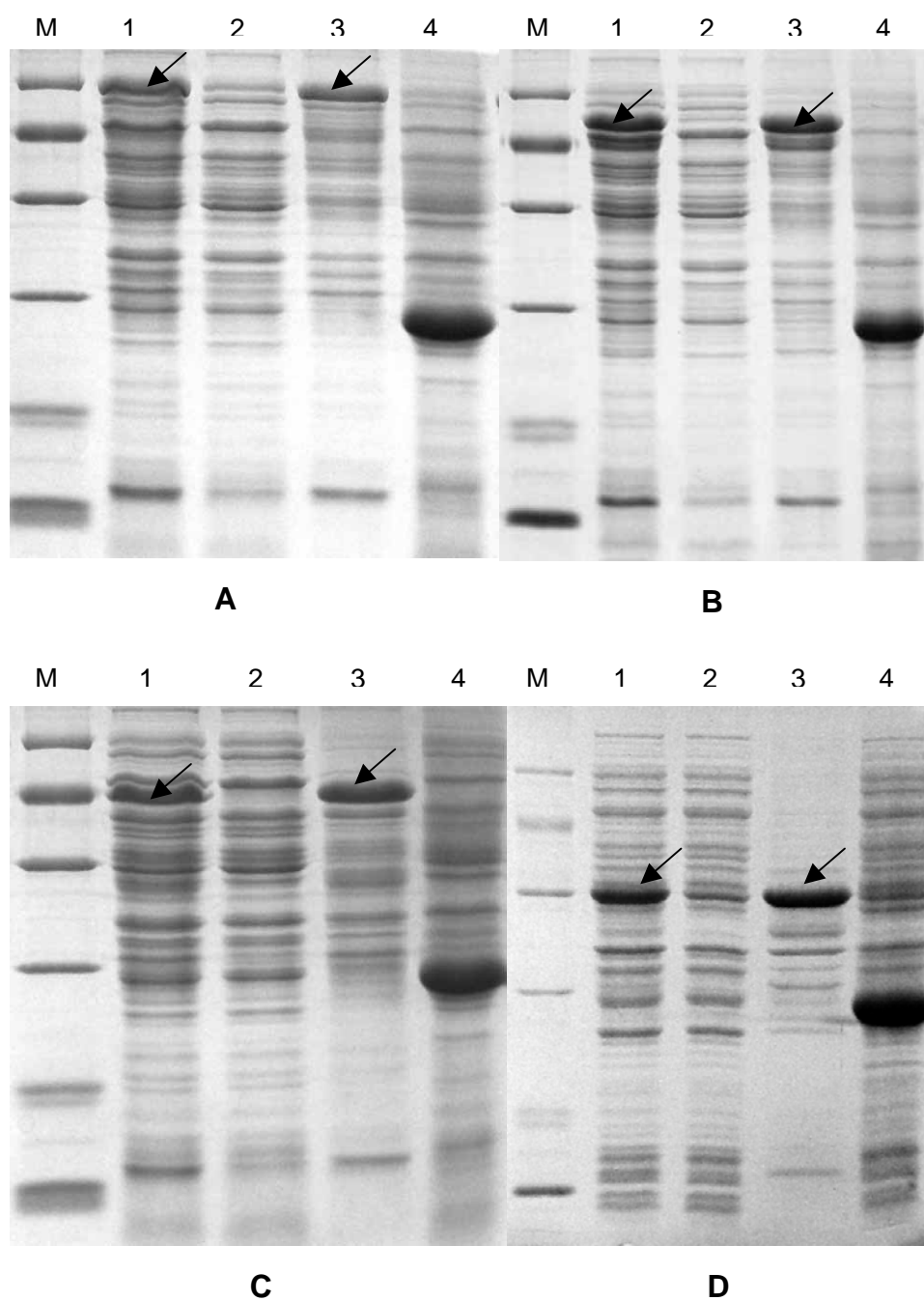


图 5-3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5-3 SDS-PAGE analysis of expression.

A pGEX-S1 表达电泳分析; B pGEX-S1N 表达电泳分析; C pGEX-S1C 表达电泳分析; D pGEX-SRBD 表达电泳分析
M 均为蛋白质分子量标准; 1 均为诱导后全菌裂解物; 2 均为裂解物上清; 3 均为裂解物沉淀; 4 均为 GST 空质粒诱导对照

2.4 表达产物的 Western blot 分析

如图 5-4 所示,所表达的融合蛋白 GST-S1, GST-S1N, GST-S1C 及 GST-SRBD 均能被 SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体 D3D1, 及 SARS 灭活病毒免疫鸡血清所识别。表明所表达的融合蛋白有免疫活性。

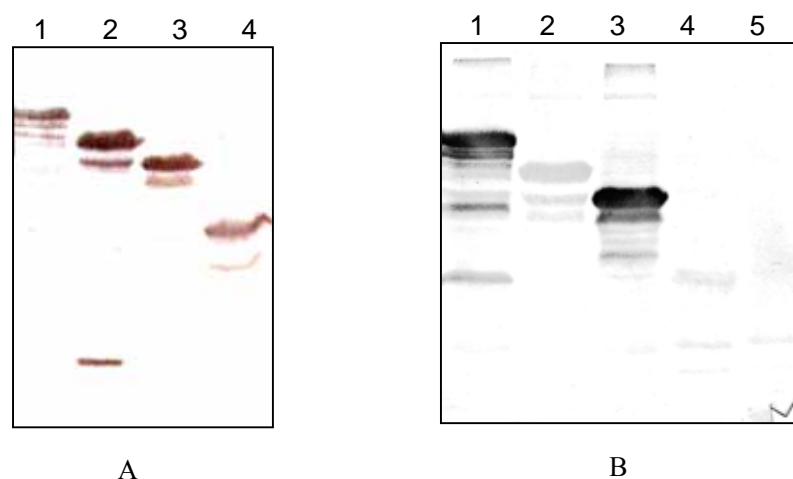


图 5-4 重组融合蛋白的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of recombinant fusion protein to MAb D3D1 and immunized chicken sera.

A 重组蛋白与单克隆抗体 D3D1 的 Western blot 分析; B 重组蛋白与免疫鸡血清的 Western blot 分析; 1 GST-S1; 2 GST-S1N; 3 GST-S1C; 4 GST-SRBD; 5 GST;

2.5 表达产物的 ELISA 分析

ELISA 结果表明免疫鸡血清与四个融合蛋白均有反应性, 其中与 S1 和 S1C 片段融合蛋白反应信号最强, 与 SRBD 片段融合蛋白反应最弱 (图 5-5)。

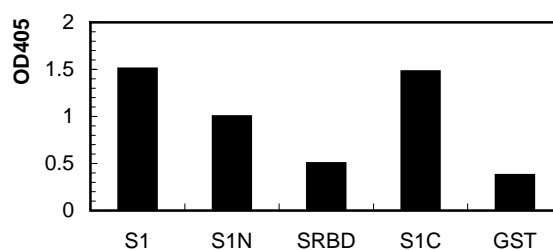


图 5-5 重组融合蛋白的 ELISA 检测

Fig.5-5 ELISA analysis of four recombinant fusion protein.

3 讨论

SARS 冠状病毒有四种主要的结构蛋白, 分别是 S 蛋白、M 蛋白、E 蛋白和 N 蛋白。S 蛋白是 SARS 冠状病毒表面的一种重要的糖蛋白, 全长 1255 个氨基酸残基。1-12AA 是信号肽序列, 13~1255AA 是成熟蛋白序列。SARS 冠状病毒 S 蛋白是 I 型糖蛋白 (Tripet 等, 2004; Bosch 等, 2003)。虽然没有证据表明 S 蛋白可以裂解为 S1 和 S2 两部分, 但是从功能分析以及与 2 群冠状病毒 S 蛋白保守基序的比较表明 SARS 冠状病毒 S 蛋白仍可以分为 S1 和 S2 两部分 (Marra 等, 2003)。S1 包含与宿主细胞表面受体结合的区域 (Li W 等, 2003; Babcock 等, 2004; Wong SK 等, 2004; Xiao 等, 2003)。S2 部分与许多其它病毒 S 蛋白一样有两个疏水的七肽跨膜重复序列, 该序列在病毒与细胞膜的融合及病毒的细胞入侵中起着重要的作用 (Tripet 等, 2004; Hofmann 等, 2004)。

S 蛋白有很好的抗原性, 在宿主的机体免疫应答中发挥重要作用。研究表明灭活的病毒免疫动物可以诱导产生保护性中和抗体 (Takasuka 等, 2003; Tang 等, 2004)。重组 S 全蛋白、部分免疫优势区域以及编码 S 蛋白的 DNA 质粒免疫动物均能诱导产生保护性中和抗体 (Yang ZY 等, 2004; Kim 等, 2004; Zeng 等, 2004; Zhu 等, 2004)。在 SARS 冠状病毒的结构蛋白中, S 蛋白是主要的免疫保护性蛋白 (Bukreyev 等, 2004; Buchholta 等, 2004)。因些在疫苗的设计中首先要了解 S 蛋白的结构与功能, 特别是对 S 蛋白进行表位鉴定是非常重要的。近来已有多次该方面的报道 (Choy 等, 2004; Wang J 等, 2003; Li J 等, 2003; Ren 等, 2003; Zhou 等, 2004; Zhang H 等, 2004; He Y 等, 2004b; Hua 等, 2004)。本研究中比较四个重组蛋白与免疫鸡血清的 Western blot 反应结果发现, GST-S1 和 GST-S1C 与免疫鸡血清呈强阳性反应, 而 GST-S1N 以及 GST-SRBD 呈弱反应, 如图 5-6 所示。据此可以推断 S1 蛋白中 C 末端 510~672AA 区域为免疫优势区域。



图 5-6 重组融合蛋白与免疫鸡血清 Western blot 反应示意图

Fig.5-6 Schematic diagram of western blot analysis result of recombinant fusion protein with immunized chicken sera.

Zhao 等 (2005a; 2005b) 通过计算机软件分析表明 S 蛋白第 450 至 650 氨基酸残基区为抗原优势区域, 可能包含优势抗原表位, 进一步克隆表达了此片段, 实验表明此片段免疫动物后能诱导动物产生中和性抗体, 并且评价了以此融合蛋白为抗原建立的 SARS 抗体检测方法。在本实验

中我们鉴定出的 S1 蛋白的优势抗原表位区域为 S510~672，Zhao 等的报道也印证了本文的结果，而且本实验鉴定的抗原表位优势区域更短，也可能更精确和具体。由于实验材料的限制，本文不能评价以 S510~672 片段融合蛋白为抗原的检测方法的效果。本文结果对进一步进行鉴定 S 蛋白的抗原表位和基于这些抗原表位优势区域以及表位序列的应用研究有重要意义。

实验五 SARS 冠状病毒 S1 蛋白主要抗原决定区的表位作图

摘 要 SARS 冠状病毒 S 蛋白第 510-672 氨基酸残基片段是 S1 上的免疫优势决定区。为了对这一免疫优势区域进行进一步的抗原表位鉴定,设计了一套 16 个部分重叠的短肽,这些短肽覆盖全部 510~672 片段。每一个短肽合成一对寡核苷酸链,退火后插入表达载体 pGEX-6p-1,与 GST 进行融合表达。各表达融合蛋白均以可溶解的形式表达。表达的融合蛋白以谷胱甘肽亲和柱层析纯化。用免疫鸡血清对 16 个短肽融合蛋白进行 Western blot 和 ELISA 反应性扫描,鉴定出了四个抗原表位。分别为 S1C3 (539~559), S1C4 (548~567), S1C7/8 (583~606) 和 S1C10/11 (607~630)。用这四个融合蛋白对小鼠进行免疫,结果表明这四个融合蛋白均能诱导小鼠产生 S 蛋白特异的抗体,且间接免疫荧光试验表明这些抗体均能识别真核表达的 S 蛋白的表面结构域。该结果可以为进一步进行基于抗原表位的 SARS 诊断、治疗试剂的研究。

关键词 SARS 冠状病毒, S 蛋白, 抗原表位

SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 是一种新发现的病毒,已证实为严重急性呼吸系统综合征 (SARS) 的病原 (Peiris 等, 2003a; Drosten 等, 2003; Ksiazek 等, 2003)。SARS 是一种致死性高度传染性疾病。在 2002 至 2003 年流行期间,该病在世界范围内约感染 8,000 余人并致死 800 余人。

SARS-CoV 为有囊膜单链正义 RNA 病毒。病毒基因组为 29.7 Kb,有 11 个开放阅读框。基因组的组织形式类似于其他的冠状病毒 (Qin ED 等, 2003)。SARS-CoV 有四种主要的结构蛋白,分别为 S, M, E 和 N 蛋白。病毒的基因组序列和氨基酸序列与其他已知的冠状病毒的同源性很低 (Qin ED 等, 2003; Rota 等, 2003; Marra 等, 2003)。尽管从其他野生动物如果子狸中分离出了 SARS-CoV 样病毒 (Guan Y 等, 2003),但是这种病毒在 2003 年前从未出现在人或其他的动物中出现过。系统进化分析表明这种新出现的 SARS-CoV 和 SARS-CoV 样病毒不属于已知的 1, 2 和 3 群动物冠状病毒中的任何一群,现把它列为第 4 群 (Eickmann 等, 2003)。

SARS-CoV S 蛋白长为 1,255 氨基酸残基。它是 1 型穿膜糖蛋白 (Bosch 等, 2003)。不同于其它冠状病毒 S 蛋白, SARS-CoV S 蛋白不被切割成 S1 和 S2 两个部分。但通过基序比对与功能分析, SARS-CoV S 蛋白仍可以分为类似于其它冠状病毒的 S1 和 S2 两个结构域 (Li J 等, 2003; Spiga 等, 2003)。S1 结构域决定了病毒的细胞嗜性,介导病毒与细胞受体的结合 (Li W 等, 2003; Wong SK 等, 2004)。S2 结构域有一个穿膜序列使 S 的锚定在病毒的囊膜上。同其它许多病毒纤突蛋白一样 SARS-CoV S 蛋白 S2 上有两个保守的七肽重复区,他们介导病毒~细胞间的膜融合过程,在病毒的细胞入侵过程中起重要作用 (Gallagher 等, 2001; Tripet 等, 2004;

Liu S 等, 2004)。S 蛋白有很好的抗原性, 它可以诱导机体产生保护性中和抗体。据报道灭活的 SARS 冠状病毒疫苗, 致弱病毒苗和重组 S 蛋白亚单位苗以及表达 S 蛋白的 DNA 疫苗均可以诱导机体产生中和抗体(Takasuka 等, 2004; Yang 等, 2004; Xiong S 等, 2004; Bukreyev 等, 2004; Bisht 等, 2004; He Y 等, 2004a)。这些特性使得 SARS 冠状病毒 S 蛋白成为研制 SARS 基因工程疫苗的首选蛋白, 而且可以应用于疾病的诊断工作。

对抗原物质的表位作图有助于了解原物质的免疫学特性, 在疫苗的设计上有重要意义。如在其它冠状病毒中已经鉴定出了线性中和表位(Daniel 等, 1993)。而且, 最近已有对 SARS 冠状病毒 S 蛋白线性表位鉴定的报道(Hua 等, 2004; Choy 等, 2004; Zhang H 等, 2004; Zhou 等, 2004)。对 S 蛋白抗原表位的鉴定已成为研究 S 蛋白结构与功能的一个重要内容。在本实验中, 我们用一套原核表达系统对覆盖整个 S1 蛋白抗原优势区(510~672) 的 16 个短肽进行了融合表达, 能过对融合蛋白组进行免疫反应扫描分析, 鉴定出了四个线性抗原表位。所有四个表位均位于 S 蛋白的表面结构域, 该工作可望为进一步研制 SARS 的诊断试剂和开发有效疫苗提供依据。

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 由哈尔滨兽医研究所步志高研究员提供。

1.2 酶与标记物

限制性内切酶 *Bam*HI, *Xho*I, *Eco*RI, T4 DNA 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 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 阳性血清及真核表达 S 蛋白抗原

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 冠状病毒高免鸡血清由哈尔滨兽医研究所 SARS 研究小组提供。含重组杆状病毒 rBac-SS 表达 S 蛋白抗原的 Sf9 细胞裂解物由哈尔滨兽医研究所步志高研究员提供。

1.4 短肽融合蛋白的设计

为了对 S1 蛋白免疫优势区域(510~672AA) 这一长 163AA 的片段 S1C_{510~672} 进行抗原表位作图, 设计了一套总数为 16 个的覆盖整个 S1C_{510~672} 的短肽, 命名为 S1C1~S1C16, 这些短肽长为 16~21AA, 部分重叠, 各肽序列及位置如表 6-1 所示。为了表达这些短肽, 设计合成了 16 对

寡核苷酸链。在编码链的 5'端引入 *Bam*HI 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*HI 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 6-2 所示。寡核苷酸由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 6-1 短肽序列与位置

Table 6-1. The sequence and the location of designed short peptides.

编号	位置(AA [*])	氨基酸序列
S1C1	510-525	VCGPKLSTDLIKNCV
S1C2	524-539	CVNFNFNGLTGTGVLT
S1C3	539-559	TPSSKRFQPFQQFGRDVSDF
S1C4	548-567	FQQFGRDVSDFDTSVRDPKT
S1C5	567-582	TSEILDISPCSFSGVS
S1C6	575-590	PCSFSGVSVITPGTNA
S1C7	583-598	VITPGTNASSEVAVLY
S1C8	591-606	SSEVAVLYQDVNCTDV
S1C9	599-614	QDVNCTDVSTAIHADQ
S1C10	607-622	STAIHADQLTPAWRIY
S1C11	615-630	LTPAWRIYSTGNNVFQ
S1C12	623-638	STGNNVFQTQAGCLIG
S1C13	631-646	TQAGCLIGAEHVDTSY
S1C14	639-654	AEHVDTSYECDIPIGA
S1C15	647-662	ECDIPIGAGICASYHT
S1C16	655-672	GICASYHTVSLLRSTSQK

Notes: AA 氨基酸残基(amino acid);S1C3 长为 21AA ,S1C4 长为 20AA ,S1C16 长为 18AA ,其它短肽长为 16AA。S1C3 即为 S539-559 (见第三章)。

表 6-2. 编码短肽寡核苷酸序列表

Table 6-2. Synthesized short peptide encoding DNA sequence.

Name*	Sequence
S1C1s	5'-gATCCgTTTgTggACCAAAATTATCCACTgACCTTATTAAGAACCAgTgTgTCTAAC-3'
S1C1a	5'-TCgAgTTAgACACACTggTTCTTAATAAggTCAGTggATAATTTTggTCCACAAACg-3'
S1C2s	5'-gATCCTgTgTCAATTTTAATTTTAATggACTCACTggTACTggTgTgTTAACTTAAC-3'
S1C2a	5'-TCgAgTTAAgTTAACACACCAgTACCAgTgAgTCCATTAAAATTAAAATTgACACAg-3'
S1C3s	5'-gATCCACTCCTTCTTCAAAGAgATTCAACCATTTCAACAATTTggCCgTgATgTTTCTgATTTC ACTC-3'
S1C3a	5'-TCgAgAgTgAAATCAgAAACATCACggCCAAATTgTTgAAATggTTgAAATCTCTTTgAAgAAggA gTg-3'
S1C4s	5'-gATCCTTTCAACAATTTggCCgTgATgTTTCTgATTTCAGTgATTCCgTTCgAgATCCTAAAACA C-3'
S1C4a	5'-TCgAgTgTTTTAggATCTCgAACggAATCAgTgAAATCAgAAACATCACggCCAAATTgTTgAAA- 3
S1C5s	5'-gATCCACATCTgAAATATTAAGACATTTACCTTgCTCTTTTgggggTgTAAgTTAAC-3'
S1C5a	5'-TCgAgTTAACTTACACCCCCAAAAGAgCAAggTgAAATgTCTAATATTTCAgATgTg-3'
S1C6s	5'-gATCCCCTTgCTCTTTTgggggTgTAAgTgTAATTACACCTggAACAAATgCTTAAC-3'
S1C6a	5'-TCgAgTTAAgCATTTgTTCCAaggTgTAATTACACTTACACCCCCAAAAGAgCAAggg-3'
S1C7s	5'-gATCCgTAATTACACCTggAACAAATgCTTCATCTgAAgTTgCTgTTCTATATTAAC-3'
S1C7a	5'-TCgAgTTAATATAgAACAgCAACTTCAGATgAAgCATTTgTTCCAaggTgTAATTACg-3'
S1C8s	5'-gATCCTCATCTgAAgTTgCTgTTCTATATCAAgATgTTAACTgCACTgATgTTTAAC-3'
S1C8a	5'-TCgAgTTAAACATCAgTgCAGTTAACATCTTgATATAgAACAgCAACTTCAGATgAg-3'
S1C9s	5'-gATCCCAAgATgTTAACTgCACTgATgTTTCTACAgCAATTCATgCAGATCAATAAC-3'
S1C9a	5'-TCgAgTTATTgATCTgCATgAATTgCTgTAgAAACATCAgTgCAGTTAACATCTTgg-3'
S1C10s	5'-gATCCTCTACAgCAATTCATgCAGATCAACTCACACCAgCTTggCgCATATATTAAC-3'
S1C10a	5'-TCgAgTTAATATATgCgCCAAGCTggTgTgAgTTgATCTgCATgAATTgCTgTAgAg-3'
S1C11s	5'-gATCCCTCACACCAgCTTggCgCATATATTCTACTggAAACAATgTATTCCAgtAAC-3'
S1C11a	5'-TCgAgTTACTggAATACATTgTTTCCAgtAgAATATATgCgCCAAGCTggTgTgAgg-3'
S1C12s	5'-gATCCTCTACTggAAACAATgTATTCCAgtACTCAAgCaggCTgTCTTATAggATAAC-3'
S1C12a	5'-TCgAgTTATCCTATAAgACAgCCTgCTTgAgTCTggAATACATTgTTTCCAgtAgAg-3'
S1C13s	5'-gATCCACTCAAgCaggCTgTCTTATAggAgCTgAgCATgTCgACACTTCTTATTAAC-3'
S1C13a	5'-TCgAgTTAATAAgAAgTgTCgACATgCTCAgCTCCTATAAgACAgCCTgCTTgAgTg-3'
S1C14s	5'-gATCCgCTgAgCATgTCgACACTTCTTATgAgTgCgACATTCTTATTggAgCTTAAC-3'
S1C14a	5'-TCgAgTTAAgCTCCAATaggAATgTCgCACTCATAAgAAgTgTCgACATgCTCAgCg-3'
S1C15s	5'-gATCCgAgTgCgACATTCTTATTggAgCTggCATTTgTgCTAgTTACCATACATAAC-3'
S1C15a	5'-TCgAgTTATgTATggTAACTAgCACAAATgCCAgtCTCCAATaggAATgTCgCACTCg-3'
S1C16s	5'-gATCCggCATTTgTgCTAgTTACCATACAgTTTCTTTATTACgTAgTACTAgCCAAAAATAAC-3'
S1C16a	5'-TCgAgTTATTTTggCTAgTACTACgTAATAAAgAAACTgTATggTAACTAgCACAAATgCCg-3'

1.5 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化

*Bam*HI, *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DH5 α , 重组子经酶切鉴定后命名为pGEX-S1C1至pGEX-S1C16, 各重组质粒送上海博亚生物技术有限公司测序以最终验证序列。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, 质粒的连接转化按前文所述方法进行。将表达菌种接种于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养过夜后, 按1:100接种于新鲜2 \times 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12,000rpm离心分离上清和沉淀; 12%凝胶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 (Pharmacia Biotech) 纯化, 操作步骤按说明进行。纯化后测定蛋白含量, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.6 鼠抗融合蛋白血清的制备

融合蛋白的纯化按前文所述方法进行。首免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 $^{\circ}$ C保存备用。

1.7 Western blot

1.7.1 检测短肽融合蛋白GST-S1C1至GST-S1C16与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 $^{\circ}$ 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2h, TTBS洗三遍后浸入1:5000稀释的HRP标记羊抗人IgG抗体, 室温作用1h, 洗涤三次后用DAB显色。与免疫鸡血清作用时鸡血清为1:200稀释, 二抗为1:5000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。

1.7.2 检测鼠抗融合蛋白血清和真核表达S蛋白的免疫反应性 含重组杆状病毒rBac-SS表达S蛋白抗原的Si9细胞裂解物经SDS-PAGE电泳后, 转印至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂乳4 $^{\circ}$ 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2h, TTBS洗三遍后浸入1:5000稀释的HRP标记羊抗人IgG抗体, 室温作用1h, 洗涤三次后用DAB显色。

1.8 ELISA

1.8.1 检测短肽融合蛋白GST-S1C1至GST-S1C16与免疫鸡血清的免疫反应性 用0.1mol/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 μ l/孔包被ELISA板, 4 $^{\circ}$ C过夜, 用5% 脱脂乳室温封闭3h。封闭后用PBST (PBS含0.1% Tween-20) 洗三遍, 加入10000倍稀释的D3D1腹水, 37 $^{\circ}$ C作用1h, PBST洗五遍; 加入1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG抗体, 37 $^{\circ}$ C作用1h, PBST洗七遍, 加入OPD显色液显色15分钟, 50 μ l/孔2mol/L H $_2$ SO $_4$ 终止, 490 nm 波长测量吸收值。

1.8.2 检测鼠抗融合蛋白血清与真核表达 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 细胞裂解物经反复冻融三次后,经 100 倍稀释包被 ELISA 板,一抗为倍比稀释的鼠抗 GST-SRBD3 血清。其它步骤同上文所述。

1.9 动物免疫

15 只 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 5 组,每组 3 只。5 组的免疫处理分别为以下五种纯化的融合蛋白: S1C3, S1C4, S1C7, S1C8 和 S1C10。第一次免疫用弗氏完全佐剂苗。加强免疫用不完全佐剂苗。每隔两周加强免疫一次。第二次加强免疫后一周采血分离血清, -20℃ 保存备用。

1.10 间接免疫荧光试验

Sf9 单层细胞感染表达 SARS-CoV S 蛋白重组杆状病毒 rBac-SS 后 72h 后,离心收集细胞, PBS 洗两遍,涂片待干燥后于丙酮中固定 15min。固定好的片子于 PBS 中洗 2min 后加入 50 倍稀释的鼠抗短肽融合蛋白血清。37℃ 孵育 1h。PBS 中洗三遍, 5min 每次。加入 100 倍稀释 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (Jackson IR), 37℃ 孵育 1h。PBS 洗三遍后,加缓冲甘油封片于显微镜下观察。

2 结果

2.1 短肽融合蛋白的表达与纯化

将编码各短肽的寡核苷酸退火后插入表达载体经诱导后,各融合蛋白均得到了表达,表达产物均为可溶解形式。各融合蛋白经亲和层析纯化后得到了纯化的融合蛋白(图 6-1)。

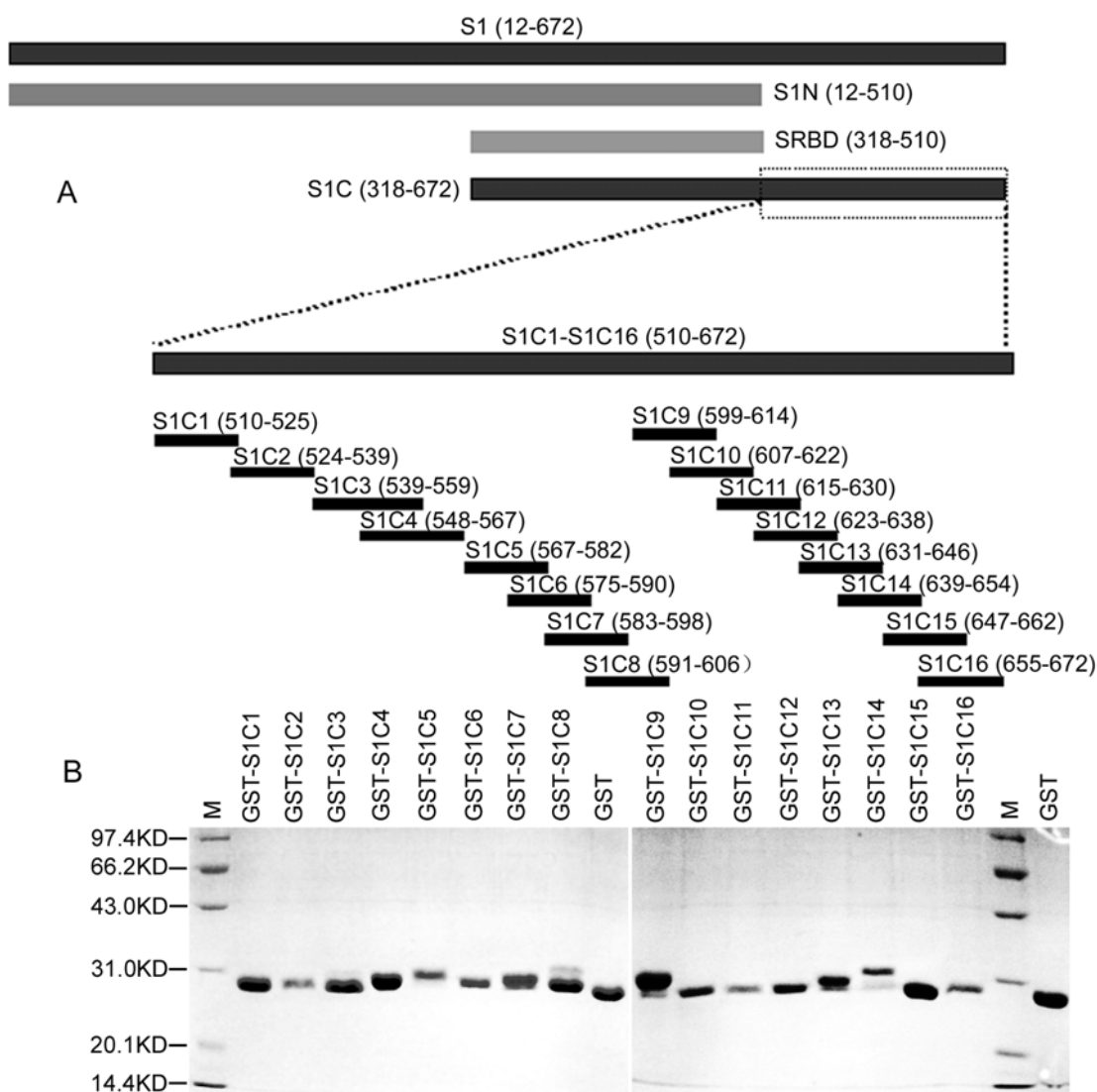


图 6-1 短肽融合蛋白组的设计表达与纯化

Fig.6-1 Design expression and purification of short peptide fused proteomics.

2.2 抗原表位作图

覆盖 S510~672 的短肽融合蛋白组经表达与纯化后,用 ELISA 和 Western blot 方法对其进行免疫反应性扫描。结果发现在 ELISA (图 6-2b) 和 Western blot (图 6-2a) 的结果中,均有 6 个融合蛋白被免疫鸡血清所识别。它们为 GST-S1C3 ,GST-S1C4 ,GST-S1C7 ,GST-S1C8 ,GST-S1C10 和 GST-S1C11。并且进一步的 ELISA 实验结果表明所有这 6 个融合蛋白与 SARS 患者康复血清反应 (图 6-3)。在这 6 个融合的短肽中,有 3 对包含重叠氨基酸序列, S1C3 和 S1C4 有 12AA

的共同序列；而 S1C7 和 S1C8 以及 S1C10 和 S1C11 则有 8AA 的重复序列。为了验证这些短肽是单独特异的抗原表位还是与重复序列有关的表位，在每对融合蛋白间进行了竞争 ELISA。结果表明 GST-S1C3 与 GST-S1C4 间有很小的竞争抑制效果，而 GST-S1C7 与 GST-S1C8 间以及 GST-S1C10 与 GST-S1C11 间则可以相互竞争抑制（图 6-4）。结果表明通过免疫反应扫描，找到了四个抗原表位，分别为：S1C3（539~559），S1C4（548~567），S1C7/8（583~606）和 S1C10/11（607~630）。

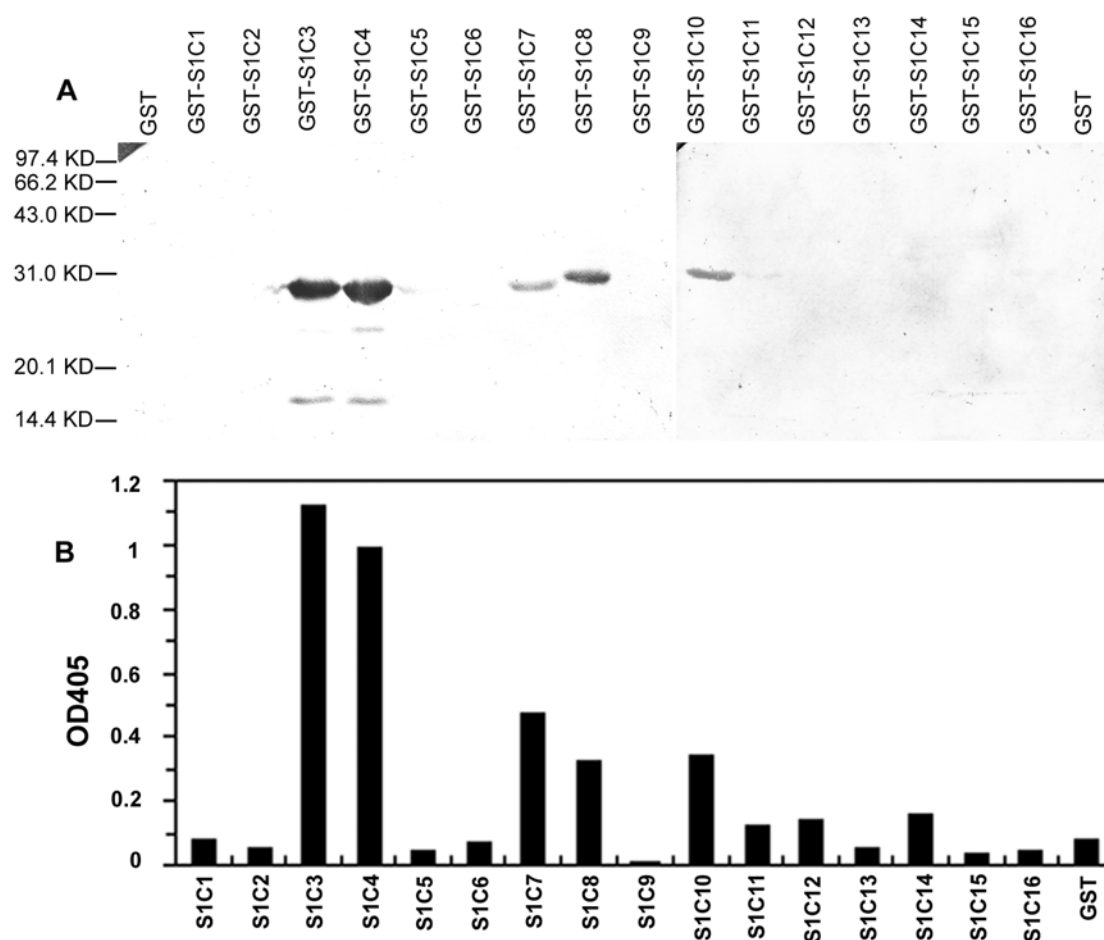


图 6-2. 融合蛋白组的 ELISA 和 Western blot 扫描

Fig.6-2 ELISA and Western blot scanning of fused proteomics with immunized chicken sera.

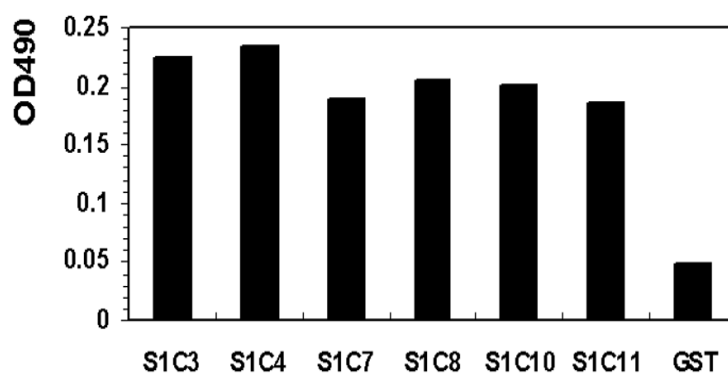


图 6-3. 表位融合蛋白与 SARS 康复患者血清的 ELISA 反应

Fig.6-3 ELISA analysis of the reactivity of epitope fused proteins to SARS convalescent sera.

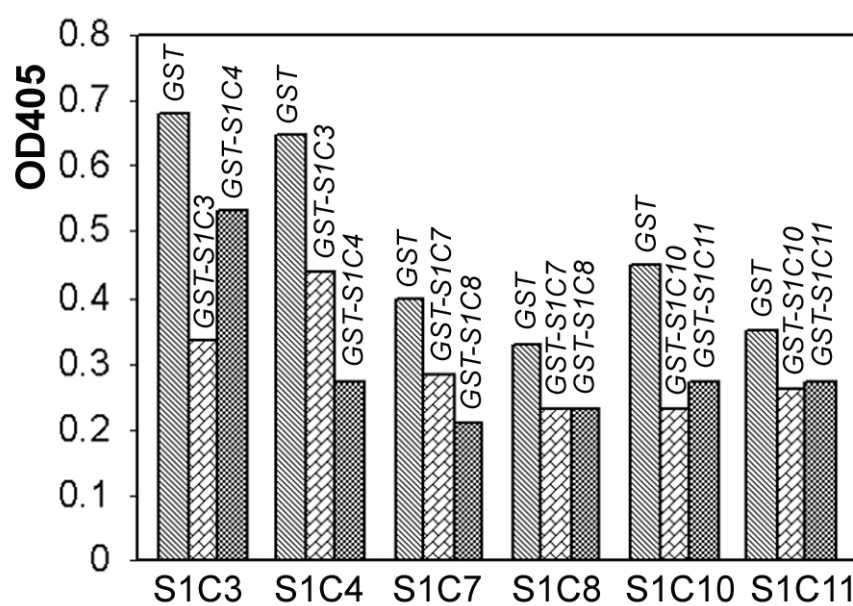


图 6-4. 表位融合蛋白的竞争抑制 ELISA

Fig.6-4 Competitive inhibition ELISA analysis of epitope fused proteins which share common amino acids sequence.

2.3 抗原表位的免疫原性

S1C3, S1C4, S1C7, S1C8 和 S1C10 融合蛋白免疫小鼠后, 均能诱导小鼠产生 S 蛋白特异的抗体产生。与真核表达 S 蛋白抗原的 ELISA 分析表明, 所有血清的效价均高于 640 倍。而 Western blot 结果表明, 只有抗 S1C4 和 S1C10 血清能识别变性的 S 蛋白抗原 (图 6-5)。

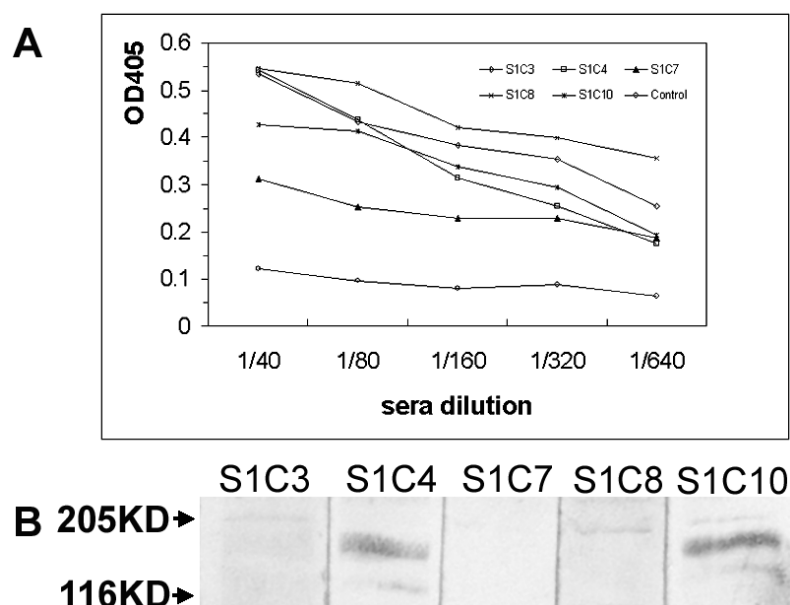


图 6-5. 融合蛋白抗血清与 S 蛋白抗原的 ELISA 和 Western blot 反应性分析

Fig.6-5 ELISA and Western blot analysis of the reactivity of sera against fusion proteins to the spike protein antigen.

2.4 抗表位单因子血清的特性

为了进一步分析各表位在 S 蛋白天然结构中的特性, 用表位单因子血清对杆状病毒在昆虫细胞中表达的 S 蛋白进行了间接免疫荧光试验。结果四种血清对阳性表达细胞均能结合, 而抗 GST 血清则不能 (图 6-6)。结果同时也提示这些表位是位于真核表达的 S 蛋白表面结构域上的。由于真核表达的 S 蛋白的结构与病毒表面 S 蛋白的构象很接近, 所以这些表位也可能位于天然 S 蛋白的表面结构域上。

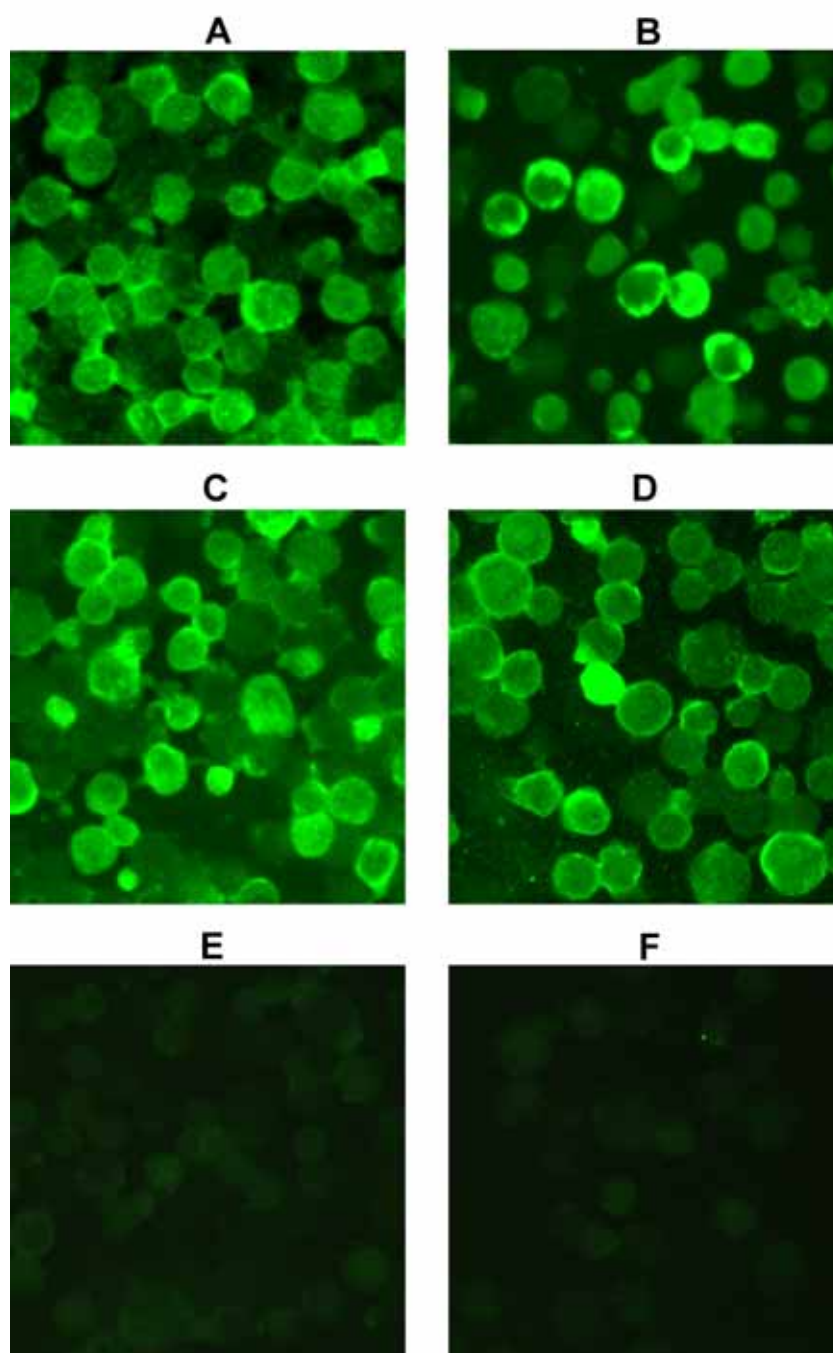


图 6-6. 表位单因子血清对表达 S 蛋白细胞的间接免疫荧光染色

Fig.6-6 Immunofluorescence analysis of epitope-specific mice antisera.

A、B、C 和 D 分别为鼠抗融合蛋白 GST-S1C3、GST-S1C4、GST-S1C8 和 GST-S1C10 血清；E 和 F 分别为鼠抗 GST 血清和未免疫鼠血清

3 讨论

在本实验中,我们用融合蛋白组免疫学反应性扫描,鉴定出了四个 S 蛋白抗原表位:S1C3 (539~559),S1C4 (548~567),S1C7/8 (583~606)和 S1C10/11 (607~630)。尽管表位 S1C3 和 S1C4 有一个 12AA 的共同序列,但是竞争 ELISA 实验表明它们仍是两个单独的表位,也可能在核心序列上,这两个表位的共有序列没有 12AA,但这需要进一步精确定位鉴定实验来验证。在所鉴定的四个抗原表位中,表位 S1C4 和 S1C10/11 所定位的序列与 (Zhou 等,2004) 等报道的两个抗原表位的基本序列是一致的,并且表位 S1C4 是一个线性中和表位。这说明 S 蛋白上也存在线性中和表位,这为进一步分析 S 蛋白结构与 SARS 疫苗的设计提供了基础和依据。本实验中对这一免疫优势区域进行了全面扫描,鉴定出了四个抗原表位。基中有两个表位是首次发现。这表明本研究方法能更全面地对 S 蛋白线抗原表位进行鉴定分析。它不同于简单地合成肽,然后用肽扫描的办法。因为肽扫描办法中,有很多抗原表位多肽在多肽链状态下很难进行 Western blot 分析,而用 ELISA 方法分析也存在缺点,因多肽在包被过程中由于与包被载体的结合,其结构受到影响,有时几乎相当于变性状态。所以不能真实地反映其与抗体的免疫反应性。

SARS 是一种高度传染性的致死性的疾病。虽然在该病暴发流行后的较短时期内该病就得到了有效的控制,但是作为一种新出现的疾病,它是有可能再度出现或者流行的。为了在将来 SARS 再发生的时候我们能有效地控制预防本病,研究制有效的 SARS 疫苗还是很重要的一项工作。并且现有的研究资料表明体液免疫可对 SARS 可提供有效的保护 (Nie Y 等,2004,Zheng 等,2004,Subarao 等,2004;ter Meulen 等,2004)。而且有与更多的实验表明灭活的 SARS 冠状病毒苗、DNA 疫苗、至弱的 SARS 冠状病毒苗以及表达的 S 蛋白亚单位疫苗均可以诱导机体产生保护性中和抗 (Takasuka 等,2004;Yang 等,2004;Xiong S 等,2004;Bukreyev 等,2004;Bisht 等,2004;He Y 等,2004a)。同其它冠状病毒一样,S 蛋白在免疫保护上起着很重要的作用,对于 SARS 冠状病毒的体液免疫保护而言,S 蛋白是病毒结构蛋白中最重要的蛋白 (Buchholz 等,2004)。尽管如些,对 SARS 疫苗研究还有很多问题要考虑,如有效性和安全性问题 (Marshall 等,2004)。因为有些动物冠状病毒存在抗体依赖性增强作用,特别是一些中和表位抗体也存在这种现象,近来来自于用动物雪貂所做的实验结果报道 SARS 冠状病毒感染能引起肝脏的炎症反应,而且这种对肝脏的损害在再次免疫后变得更严重 (Weingartl 等,2004)。所以在我们很乐观在热忠于体液免疫保护研究的同时也要考虑安全性问题。

实验六 SARS 冠状病毒 S 蛋白受体结合结构域的表达及其表位作图

摘 要 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。在本实验中首先克隆并用 pGEX-6p-1 载体融合表达了该受体结合结构域,并且通过 Western blot 分析表明该受体结合结构域融合蛋白能被 SARS 康复患者清和 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 氨基酸残基的部分重叠的短肽,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 Western blot 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)。本结果对进一步分析 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 (SARS); 冠状病毒; 纤突蛋白 (S 蛋白); 表达; 抗原表位

严重急性呼吸系统综合征 (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 8000 余人感染并导致 800 余人死亡。该病的病源是一种新型的冠状病毒,即 SARS 冠状病毒。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。SARS 冠状病毒 S 蛋白有 1255AA,其中 12~672AA 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 区域,与细胞受体 ACE2 结合。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*HI, *Xho*I, *Eco*RI, 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 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冠状病毒高免鸡血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所SARS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。

1.4 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' CGCGGATCCAATATTACAACTTGTGTCC 3' ;pSRBDa :5' TAACTCGAGAACCG TGGCCGGTGCATTTA 3'。在正向引物的5'端引入*Bam*HI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: dH₂O 33μl, 10×PCR buffer 5μl, 25pmol/L上下游引物各1μl, 25mmol/L dNTP 4μl, 模板DNA5μl, Ex-Taq DNA聚合酶1μl, 总体积50μl。PCR反应条件为: 94 4min (94 30s, 55 1min, 72 2min)循环35次, 72 5min, 4 保存。PCR产物经*Bam*HI, *Xho*I双切回收后-20 存放备用; *Bam*HI, *Xho*I双切质粒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, 质粒的连接转化按前文所述方法进行。将表达菌种接种于含100μg/ml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 (A₆₀₀ = 0.5~0.7), 加IPTG诱导, 培养物离心后用1/20体积PBS重悬, 超声波裂解后12,000rpm离心分离上清和沉淀; 12% 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 (318~510AA) 这一长193AA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16AA (SRBD23为17AA), 有8AA重叠 (表7-1)。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*HI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*HI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7-2所示。寡核苷酸由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 7-1. 覆盖受体结合结构域的部分重叠短肽的设计表

Table 7-1. Designed short peptides spanning the receptor binding domain.

编号	起始位置 (AA [*])	序列
SRBD1	318~333	NITNLCPFGEVFNATK
SRBD2	326~341	GEVFNATKFPSVYawe
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	ADYNYKLPPDDFMGCVL
SRBD13	414~429	DDFMGCVLAWNTRNID
SRBD14	422~437	AWNTRNIDATSTGNYN
SRBD15	430~445	ATSTGNYNKYRYLRH
SRBD16	438~453	YKYRYLRHGKLRPFER
SRBD17	446~461	GKLRPFERDISNVPFS
SRBD18	454~469	DISNVPFSPDGKPCTP
SRBD19	462~477	PDGKPCTPPALNCYWP
SRBD20	470~485	PALNCYWPLNDYGFYT
SRBD21	478~493	LNDYGFYTTTGIGYQP
SRBD22	486~501	TTGIGYQPYRVVLSF
SRBD23 ^{**}	494~510	YRVVLSFELLNAPATV

* AA, amino acid

** SRBD1-SRBD22 长度均为 16AA, SRBD23 长度为 17AA

表 7-2. 编码短肽寡核苷酸序列表

Table 7-2. Synthesized DNA sequences which encoding the short peptides.

No.	Name	Sequence
1	Srbd-1s	5'-gATCCAATATTACAAACTTgTgTCCTTTTggAgAggTTTTTAATgCTACTAAATAAC-3'
	Srbd-1a	5'-TCgAgTTATTTAgTAGCATTA AAAACCTCTCCAAAaggACACAAGTTTgTAATATTg-3'
2	Srbd-2s	5'-gATCCggAgAggTTTTTAATgCTACTAAATTCCCTTCTgTCTATgCATgggAgTAAC-3'
	Srbd-2a	5'-TCgAgTTACTCCCATgCATAgACAgAAgggAATTTAgTAGCATTA AAAACCTCTCCg-3'
3	Srbd-3s	5'-gATCCTTCCCTTCTgTCTATgCATgggAgAgAAAAAAATTTCTAATTgTgTTTAAC-3'
	Srbd-3a	5'-TCgAgTTAAACACAATTAgAAATTTTTTTCTCTCCCATgCATAgACAgAAgggAAg-3'
4	Srbd-4s	5'-gATCCAgAAAAAAATTTCTAATTgTgTTgCTgATTACTCTgTgCTCTACAAC TAAC-3'
	Srbd-4a	5'-TCgAgTTAgTTgTAGAgCACAgAgTAATCAgCAACACAATTAgAAATTTTTTTCTg-3'
5	Srbd-5s	5'-gATCCgCTgATTACTCTgTgCTCTACAAC TAACATTTTTTTCAACCTTTAAgTAAC-3'
	Srbd-5a	5'-TCgAgTTACTTAAAggTTgAAAAAAATgTTgAgTTgTAGAgCACAgAgTAATCAgCg-3'
6	Srbd-6s	5'-gATCCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAgTgCTATggCgTTTCTgCCACTAAgTAAC-3'
	Srbd-6a	5'-TCgAgTTACTTAgTggCagAAACgCCATAgCACTTAAAggTTgAAAAAAATgTTgAg-3'
7	Srbd-7s	5'-gATCCTgCTATggCgTTTCTgCCACTAAgTTgAATgATCTTTgCTTCTCCAATTAAC-3'
	Srbd-7a	5'-TCgAgTTAATTggAgAAgCAAAgATCATTCAACTTAgTggCagAAACgCCATAgCag-3'
8	Srbd-8s	5'-gATCCTTgAATgATCTTTgCTTCTCCAATgTCTATgCagATTCTTTTgTAGTCTAAC-3'
	Srbd-8a	5'-TCgAgTTAgACTACAAAAGAATCTgCATAgACATTggAgAAgCAAAgATCATTCAG-3'
9	Srbd-9s	5'-gATCCgTCTATgCagATTCTTTTgTAGTCAAgggAgATgATgTAAgACAAATATAAC-3'
	Srbd-9a	5'-TCgAgTTATATTTgTCTTACATCATCTCCCTTgACTACAAAAGAATCTgCATAgACg-3'
10	Srbd-10s	5'-gATCCAaggAgATgATgTAAgACAAATAgCgCCAggACAAACTggTgTTATTTAAC-3'
	Srbd-10a	5'-TCgAgTTAAATAACACCAgTTTgTCCTggCgCTATTTgTCTTACATCATCTCCCTTg-3'
11	Srbd-11s	5'-gATCCgCgCCAggACAAACTggTgTTATgCTgATTATAATTATAAATTgCCATAAC-3'
	Srbd-11a	5'-TCgAgTTATggCAATTTATAATTATAATCAgCAATAACACCAgTTTgTCCTggCgCg-3'
12	Srbd-12s	5'-gATCCgCTgATTATAATTATAAATTgCCAgATgATTTCATgggTTgTgTCCTTTAAC-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'-TCgAgTTAATgTCTAAgATACCTATATTTATAATTATAATTACCAgTTgAAgTAGCg-3'
16	Srbd-16s	5'-gATCCTATAAATATAggTATCTTAgACATggCAAgCTTAaggCCCTTTgAgAgATAAC-3'
	Srbd-16a	5'-TCgAgTTATCTCTCAAAgggCCTAAgCTTgCCATgTCTAAgATACCTATATTTATAg-3'
17	Srbd-17s	5'-gATCCggCAAgCTTAaggCCCTTTgAgAgAgACATATCTAATgTgCCTTTCTCCTAAC-3'

	Srbd-17a	5'-TCgAgTTAggAgAAAaggCACATTAgATATgTCTCTCTCAAagggCCTAAgCTTgCCg-3'
	Srbd-18s	5'-gATCCgACATATCTAATgTgCCTTTCTCCCCTgATggCAAACCTTgCACCCCATAAC-3'
18	Srbd-18a	5'-TCgAgTTATggggTgCAAaggTTTgCCATCAggggAgAAAaggCACATTAgATATgTCg-3'
	Srbd-19s	5'-gATCCCTgATggCAAACCTTgCACCCCACCTgCTCTTAATTgTTATTggCCATAAC-3'
19	Srbd-19a	5'-TCgAgTTATggCCAATAACAATTAAgAgCAggTggggTgCAAaggTTTgCCATCAggg-3'
	Srbd-20s	5'-gATCCCTgCTCTTAATTgTTATTggCCATTAAATgATTATggTTTTTACACCTAAC-3'
20	Srbd-20a	5'-TCgAgTTAggTgTAAAAACCATAATCATTTAATggCCAATAACAATTAAgAgCAggg-3'
	Srbd-21s	5'-gATCCTTAAATgATTATggTTTTTACACCACTACTggCATTggCTACCAACCTTAAAC-3'
21	Srbd-21a	5'-TCgAgTTAAaggTTggTAgCCAATgCCAgTAgTggTgTAAAAACCATAATCATTTAAg-3'
	Srbd-22s	5'-gATCCACTACTggCATTggCTACCAACCTTACAgAgTTgTAgTACTTTCTTTTAAAC-3'
22	Srbd-22a	5'-TCgAgTTAAAAAgAAAgtACTACAACCTCTgTAAggTTggTAgCCAATgCCAgTAgTg-3'
	Srbd-23s	5'-gATCCTACAgAgTTgTAgTACTTTCTTTTgAACTTTTAAATgCACCGgCCACggtTTTAAAC-3'
23	Srbd-23a	5'-TCgAgTTAAACCgTggCCggTgCATTTAAAAgTTCAAAAgAAAgtACTACAACCTCTgTAg-3'

1.6 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达纯化

*Bam*HI, *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; T4 DNA连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌DH5 α , 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最终验证序列。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, 质粒的连接转化按前文所述方法进行。将表达菌种接种于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养过夜后, 按1:100接种于新鲜2 \times 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12,000rpm离心分离上清和沉淀; 12%凝胶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(Pharmacia Biotech)纯化, 操作步骤按说明进行。纯化后测定蛋白含量, -20 $^{\circ}$ 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12,000rpm离心分离上清和沉淀, 包涵体沉淀再经PBS悬浮和超声波洗涤三次, 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%凝胶SDS-PAGE电泳切胶回收相应蛋白条带。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 $^{\circ}$ C保存备用。

融合蛋白GST-SRBD3的纯化按前文所述方法进行。首免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℃保存备用。

1.8 Western blot

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电泳后，转印至硝酸纤维素膜上，5%脱脂乳4℃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2h，TTBS洗三遍后浸入1:5000稀释的HRP标记羊抗人IgG抗体，室温作用1h，洗涤三次后用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℃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2h，TTBS洗三遍后浸入1:5000稀释的HRP标记羊抗人IgG抗体，室温作用1h，洗涤三次后用DAB显色。与免疫鸡血清作用时鸡血清为1:200稀释，二抗为1:5000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至GST-SRBD23与单克隆抗体D3D1的免疫反应性 用0.1mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将超声裂解物上清经50倍稀释，以100μl/孔包被ELISA板，4℃过夜，用5%脱脂乳室温封闭3h。封闭后用PBST(PBS含0.1% Tween-20)洗三遍，加入10000倍稀释的D3D1腹水，37℃作用1h，PBST洗五遍；加入1:5000稀释的HRP标记羊抗鼠IgG抗体，37℃作用1h，PBST洗七遍，加入OPD显色液显色15分钟，50μl/孔2mol/L H₂SO₄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。其它步骤同上文所述。

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0.1mmol/L IPTG 37

诱导 4h 后经 12%凝胶 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 43kD，与预期大小一致（图 7-1）。Western blot 结果表明，表达融合蛋白 GST-SRBD 能被单克隆抗体 D3D1 和 SARS 病人康复期血清所识别，如图 7-2 所示，箭头所示为 GST-SRBD 条带。

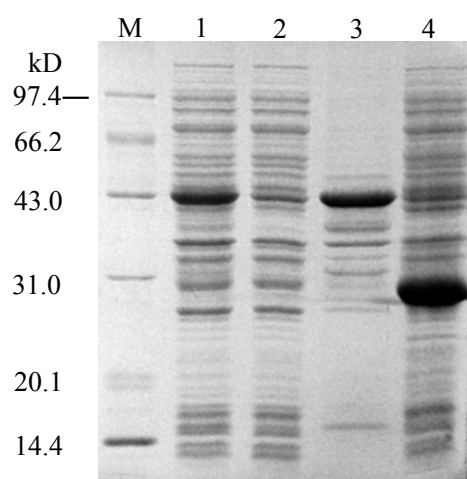


图 7-1. GST-SRBD 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.7-1 SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein GST-SRBD

M, 中分子量蛋白质标准；1, 诱导表达全菌；2, 诱导表达菌裂解物上清；3 诱导表达菌裂解物沉淀；4, GST 诱导表达对照

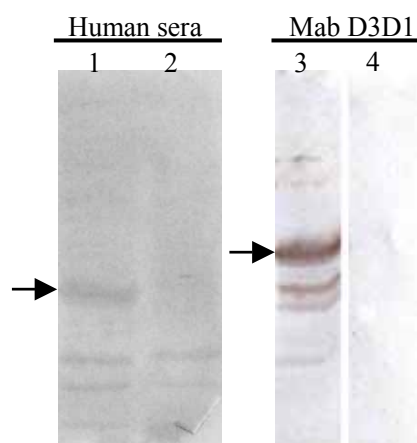


图 7-2. GST-SRBD Western blot 分析

Fig.7-2 Western blot analysis of fusion protein GST-SRBD

1、3, GST-SRBD；2、4, GST 对照

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 至 pGEX-SRBD23, 重组质粒转化宿主菌 BL21 后用 0.1mmol/L IPTG 37 °C 诱导 4h 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 Western blot 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 7-3)。表达产物的纯化按上文所述方法进行, SRBD3 的纯化结果如图 7-4 所示。

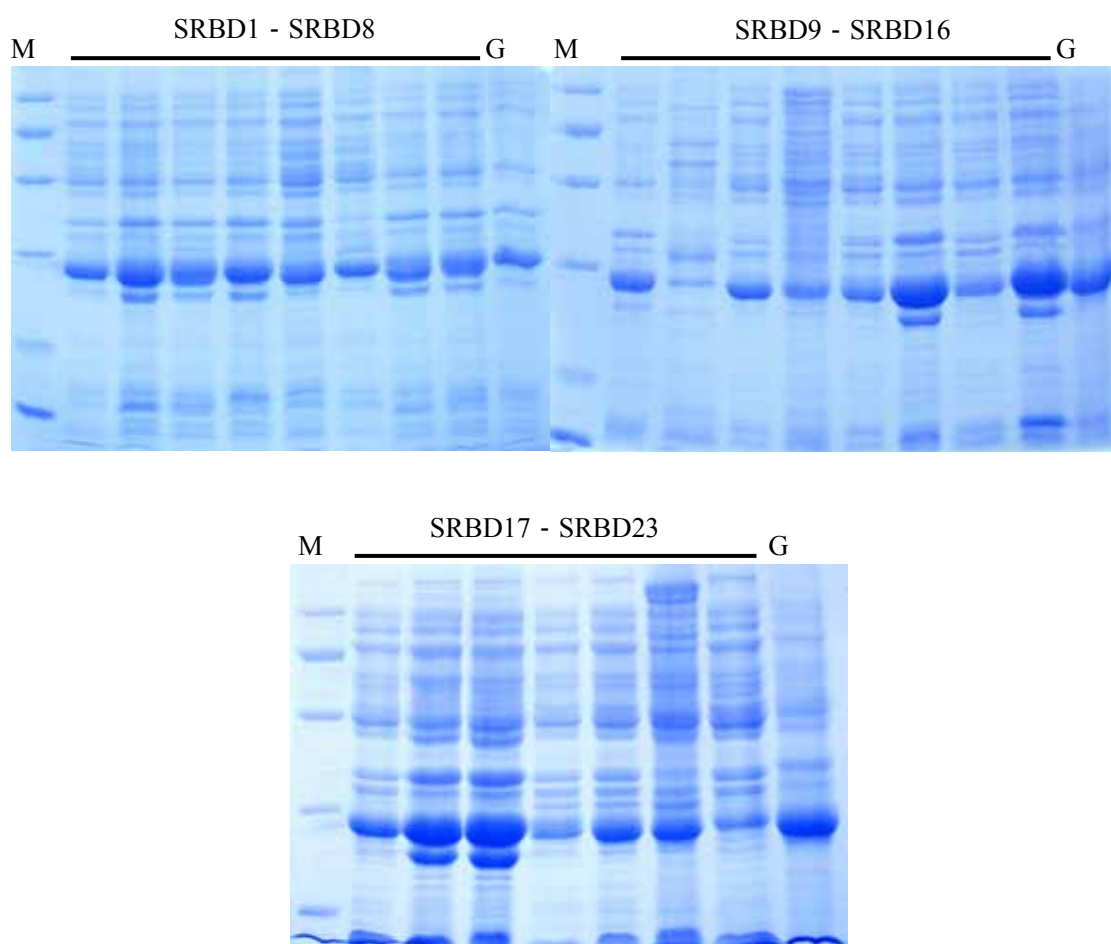


图 7-3. 表达 SRBD1 - SRBD23 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.7-3 SDS-PAGE analysis of short peptide SRBD1 to SRBD23 fusion protein.

M, 中分子量蛋白质标准; G, GST 诱导表达对照; SRBD1-SRBD23, 融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23

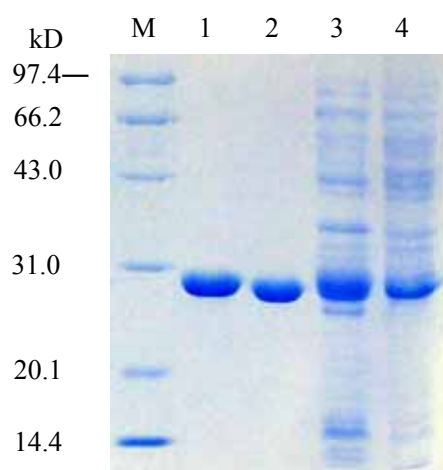


图 7-4. 融合蛋白 GST-SRBD3 的纯化

Fig.7-4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant fusion protein GST-SRBD3.

M, 中分子量蛋白质标准; 1, 纯化的 GST-SRBD3; 2, 纯化的 GST 对照; 3, GST-SRBD3 诱导表达上清对照; 4, GST 诱导表达对照

2.3 短肽融合蛋白的 Western blot 分析与 ELISA 分析

Western blot 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 7-5); ELISA 分析结果表明 GST-SRBD17 能被单克隆抗体 D3D1 识别(图 7-6)。

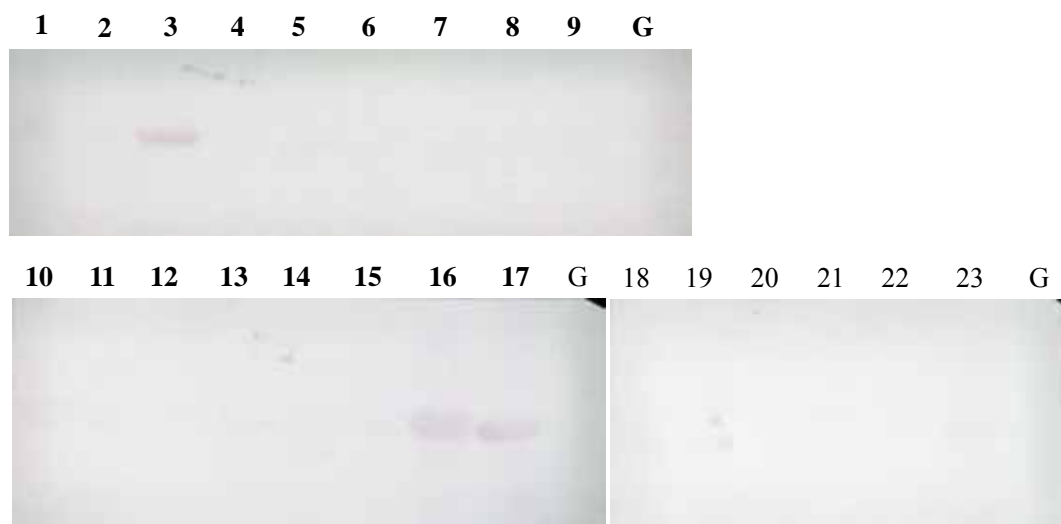


图 7-5. 短肽融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23 与免疫鸡血清的 Western blot 分析

Fig.7-5 Western blot analysis the reactivity of immunized chicken sera to short peptide-fused protein GST-SRBD1 to GST-SRBD23

1-23, 融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23; G, GST 对照

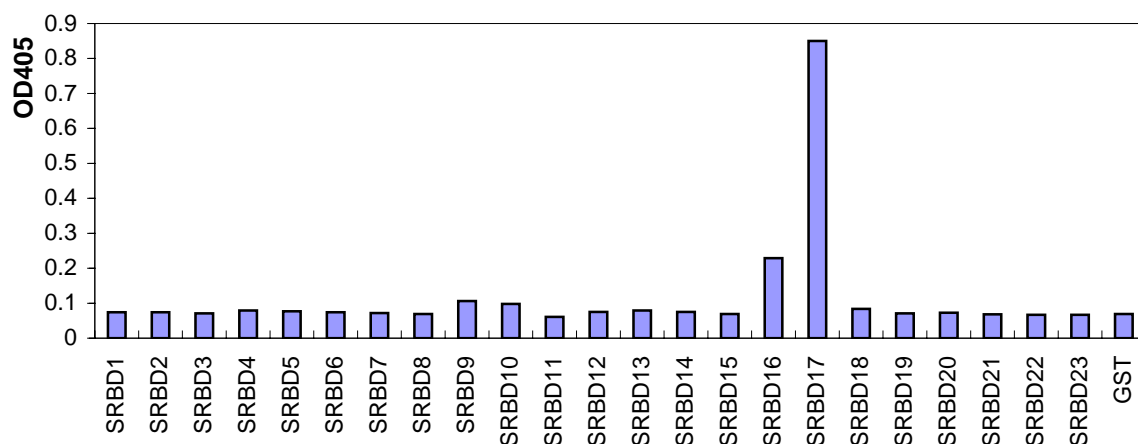


图 7-6. 短肽融合蛋白 GST-SRBD1 至 GST-SRBD23 与单抗 D3D1 的 ELISA 分析

Fig.7-6 ELISA analysis of the reactivity of fusion proteins GST-SRBD1 to GST-SRBD23 to the monoclonal antibody D3D1.

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 7-7)。同时 Western blot 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。

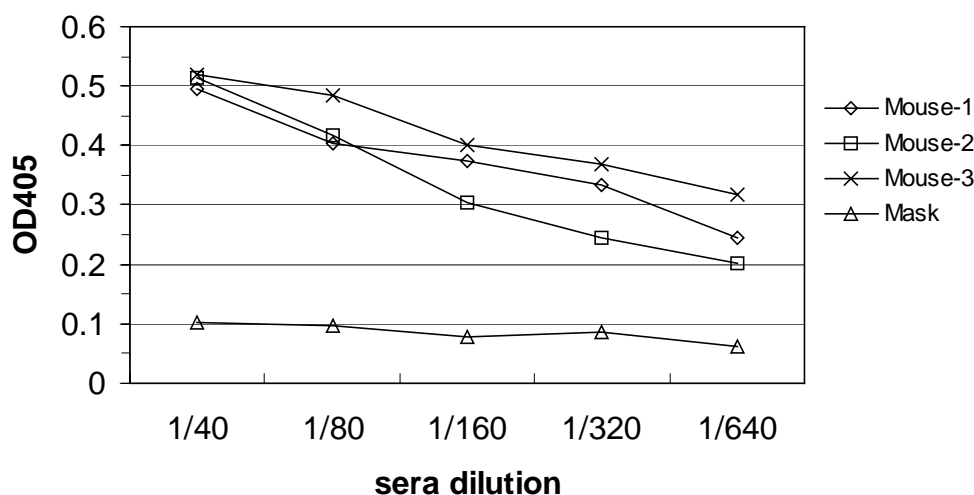


图 7-7. GST-SRBD3 抗血清与杆状病毒表达 S 蛋白反应性的 ELISA 分析

Fig.7-7 ELISA analysis of the reactivity of GST-SRBD3 immunized mice sera to recombinant baculovirus expressed full-length spike protein.

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 Western blot 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, 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 至 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 7-8)。

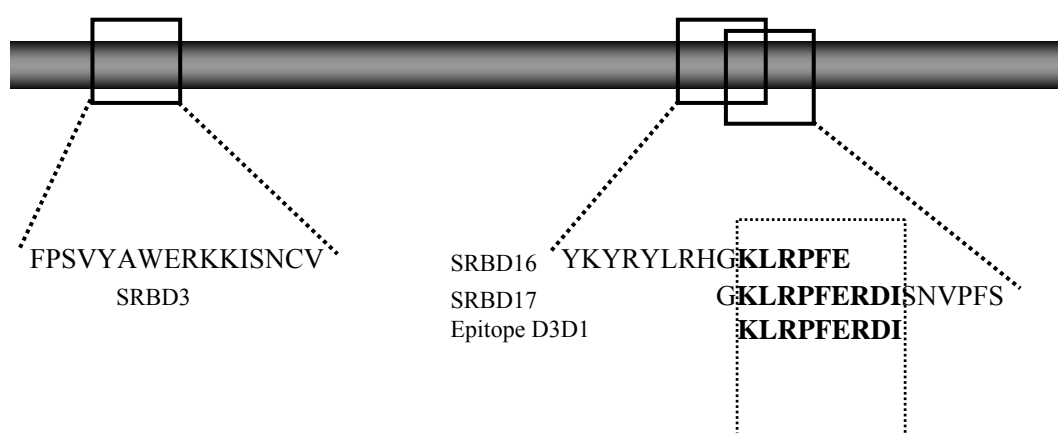


图 7-8. S 蛋白受体结合区表位作图结果示意图

Fig.7-8 Schematic diagram of epitope mapping results of spike protein receptor binding domain.

3 讨论

SARS 冠状病毒 S 蛋白同其它冠状病毒 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。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。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 为在实验二中已进行了精确鉴定的线性表位。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 (2004) 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 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。在其它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。位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 (Daniel 等, 1993; Daniel 等, 1994; Koolen 等, 1990)。有一个例子如鼠肝炎病毒 MHV S 蛋白的中和表位 A (Luytjes 等, 1989; Talbot 等, 1984; Talbot 等, 1985), 当它用 pET 3x 表达系统表达 (Daniel 等, 1993) 或与 BSA 偶联 (Daniel 等, 1994) 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 (Daniel 等, 1994)。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 (Koo 等, 1999; Koolen 等, 1990; Yu 等, 2000)。所以要进一步了解表位 SRBD3 的免疫特性,进行各种其它的尝试是有必要的。

结论

1. 通过生物信息学预测方法预测 12 个结构蛋白抗原表位, 构建并表达了四个多预测表位嵌合基因, 制备了两株 S 蛋白特异的单克隆抗体, 用这两株单克隆抗体鉴定出了两个 S 蛋白线性表位, 其核心序列分别为 P₇₈₉DPLKPTKR₇₉₇ (D3C5) 和 K₄₄₇LRPFERDI₄₅₅ (D3D1)。
2. 用 S 蛋白特异的中和性单克隆抗体 2C5 为靶分子, 对噬菌体展示的随机七肽库进行筛选, 得到了一个模拟表位 (TPEQQFT)。
3. 融合表达了 23 个部分重叠的覆盖受体结合结构域全长的 16 肽, 用抗 SARS-CoV 血清和 S 蛋白单抗进行免疫反应性扫描, 鉴定出了两个线性抗原表位, 其中一个为单克隆抗体 D3D1 表位, 另一个为 F₃₃₄PSVYAWERKKISNCV₃₄₉ (SRBD3)。
4. 表达了 S 蛋白的四个片段, S1、S1N、S1C、SRBD。通过 Western blot 分析得出 S1 中第 510~672 氨基酸残基的片段为免疫优势决定区。
5. 融合表达了 16 个部分重叠的覆盖 S1 免疫优势决定区 (510~672) 的多肽, 用抗 SARS-CoV 血清进行免疫反应性扫描, 鉴定出了四个线性抗原表位 S1C3 (539~559), S1C4 (548~567), S1C7/8 (583~606) 和 S1C10/11 (607~630), 其中两个表位 (S1C3 和 S1C7/8) 为新确认的表位, 另两个表位 (S1C4 和 S1C10/11) 与现有的报道相符合。这四个表位集中在 S 蛋白第 539~630 氨基酸残基区。该结果对进一步开发研制诊断试剂和疫苗设计研究有重要意义。

参考文献

1. 芮伟, 张其鹏, 石磊等. SARS 冠状病毒基因组、蛋白质与侵入宿主细胞过程近况. <http://cmbi.bjmu.edu.cn>
2. 张其鹏, 石磊, 芮伟等. SARS冠状病毒基因组初步分析. 北京大学学报(医学版), 2003, 35: 128-129
3. Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, and Hilgenfeld R, Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. Science, 2003, 300(5626): 1763-7.
4. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, and Warren G, Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. Nature, 1984, 308(5961): 751-2.
5. Babcock GJ, Eshshaki DJ, Thomas WD, Jr., and Ambrosino DM, 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.
6. Berry JD, Jones S, Drebot MA, Andonov A, Sabara M, Yuan XY, Weingartl H, Fernando L, Marszal P, Gren J, Nicolas B, Andonova M, Ranada F, Gubbins MJ, Ball TB, Kitching P, Li Y, Kabani A, and Plummer F, Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus. J Virol Methods, 2004, 120(1): 87-96.
7. Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR, Subbarao K, and Moss B, Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. PNAS, 2004, 101(17): 6641-6646.
8. Bonavia A, Zelus BD, Wentworth DE, Talbot PJ, and Holmes KV, Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. J Virol, 2003, 77(4): 2530-8.
9. Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, Walmsley SL, Mazzulli T, Avendano M, Derkach P, Ephtimios IE, Kitai I, Mederski BD, Shadowitz SB, Gold WL, Hawryluck LA, Rea E, Chenkin JS, Cescon DW, Poutanen SM, and Detsky AS, Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. Jama, 2003, 289(21): 2801-9.

10. Bos EC, Luytjes W, van der Meulen HV, Koerten HK, and Spaan WJ, The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology*, 1996, 218(1): 52-60.
11. Bosch BJ, Martina BE, Van Der Zee R, Lepault J, Haijema BJ, Versluis C, Heck AJ, De Groot R, Osterhaus AD, and Rottier PJ, Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(22): 8455-60.
12. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, and Rottier PJM, The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.*, 2003, 77(16): 8801-8811.
13. Brandenburg AH, de Waal L, Timmerman HH, Hoogerhout P, de Swart RL, and Osterhaus AD, HLA class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J Virol*, 2000, 74(21): 10240-4.
14. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, and Collins PL, Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *PNAS*, 2004, 101(26): 9804-9809.
15. Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, Vogel LN, Elkins WR, St Claire M, Murphy BR, Subbarao K, and Collins PL, Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2122-7.
16. Cavanagh D, Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol*, 2003, 32(6): 567-82.
17. Cerino A, Meola A, Segagni L, Furione M, Marciano S, Triyatni M, Liang TJ, Nicosia A, and Mondelli MU, Monoclonal antibodies with broad specificity for hepatitis C virus hypervariable region 1 variants can recognize viral particles. *J Immunol*, 2001, 167(7): 3878-86.
18. Chang MS, Lu YT, Ho ST, Wu CC, Wei TY, Chen CJ, Hsu YT, Chu PC, Chen CH, Chu JM, Jan YL, Hung CC, Fan CC, and Yang YC, Antibody detection of SARS-CoV spike and nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(4): 931-6.
19. Che XY, Qiu LW, Pan YX, Wen K, Hao W, Zhang LY, Wang YD, Liao ZY, Hua X, Cheng VC, and Yuen KY, Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for

- detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(6): 2629-35.
20. Chen F, Chan KH, Jiang Y, Kao RY, Lu HT, Fan KW, Cheng VC, Tsui WH, Hung IF, Lee TS, Guan Y, Peiris JS, and Yuen KY, In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J Clin Virol*, 2004, 31(1): 69-75.
 21. Chen Z, Pei D, Jiang L, Song Y, Wang J, Wang H, Zhou D, Zhai J, Du Z, Li B, Qiu M, Han Y, Guo Z, and Yang R, Antigenicity analysis of different regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *Clin Chem*, 2004, 50(6): 988-95.
 22. Chou TH, Wang S, Sakhatskyy PV, Mboudoudjeck I, Lawrence JM, Huang S, Coley S, Yang B, Li J, Zhu Q, and Lu S, Epitope mapping and biological function analysis of antibodies produced by immunization of mice with an inactivated Chinese isolate of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology*, 2005, 334(1): 134-43.
 23. Choy W-Y, Lin S-G, Chan PK-S, Tam JS-L, Lo YMD, Chu IM-T, Tsai S-N, Zhong M-Q, Fung K-P, Waye MM-Y, Tsui SK-W, Ng K-O, Shan Z-X, Yang M, Wu Y-L, Lin Z-Y, and Ngai S-M, Synthetic Peptide Studies on the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Spike Glycoprotein: Perspective for SARS Vaccine Development. *Clin. Chem.*, 2004, 50(6): 1036-1042.
 24. Cologna R and Hogue BG, Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J Virol*, 2000a, 74(1): 580-3.
 25. Cologna R, Spagnolo JF, and Hogue BG, Identification of nucleocapsid binding sites within coronavirus-defective genomes. *Virology*, 2000b, 277(2): 235-49.
 26. Daniel C, Anderson R, Buchmeier MJ, Fleming JO, Spaan WJ, Wege H, and Talbot PJ, 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): 1185-94.
 27. Daniel C, Lacroix M, and Talbot PJ, 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): 540-9.
 28. Dell'Orco M, Saldarelli P, Minafra A, Boscia D, and Gallitelli D, Epitope mapping of Grapevine virus A capsid protein. *Arch Virol*, 2002, 147(3): 627-34.

29. Di B, Hao W, Gao Y, Wang M, Wang YD, Qiu LW, Wen K, Zhou DH, Wu XW, Lu EJ, Liao ZY, Mei YB, Zheng BJ, and Che XY, Monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high sensitivity of the nucleocapsid protein in acute-phase sera of severe acute respiratory syndrome patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(1): 135-40.
30. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RAM, Berger A, Burguiere A-M, Cinatl J, Eickmann M, Escriu N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra J-C, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk H-D, Osterhaus ADME, Schmitz H, and Doerr HW, Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348(20): 1967-1976.
31. Eickmann M, Becker S, Klenk H-D, Doerr HW, Stadler K, Censini S, Guidotti S, Massignani V, Scarselli M, Mora M, Donati C, Han JH, Song HC, Abrignani S, Covacci A, and Rappuoli R, Phylogeny of the SARS Coronavirus. *Science*, 2003, 302(5650): 1504b-1505.
32. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, and Boger J, Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*, 1985, 55(3): 836-9.
33. Enserink M, Infectious diseases. One year after outbreak, SARS virus yields some secrets. *Science*, 2004a, 304(5674): 1097.
34. Enserink M, SARS treatment. Interferon shows promise in monkeys. *Science*, 2004b, 303(5662): 1273-5.
35. Fowler RA, Lapinsky SE, Hallett D, Detsky AS, Sibbald WJ, Slutsky AS, and Stewart TE, Critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *Jama*, 2003, 290(3): 367-73.
36. Gallagher TM and Buchmeier MJ, Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, 279(2): 371-4.
37. Gao W, Tamin A, Soloff A, D'Aiuto L, Nwanegbo E, Robbins PD, Bellini WJ, Barratt-Boyes S, and Gambotto A, Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1895-6.
38. Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A, Hernandez HJ, Thomas WD, Jr., Coccia JA, Graziano RF, Srinivasan M, Lowy I, Finberg RW, Subbarao K, Vogel L, Somasundaran M, Luzuriaga K, Sullivan JL, and Ambrosino DM, Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J Infect Dis*, 2005, 191(4): 507-14.

39. Guan M, Chan KH, Peiris JS, Kwan SW, Lam SY, Pang CM, Chu KW, Chan KM, Chen HY, Phuah EB, and Wong CJ, Evaluation and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay and an immunochromatographic test for serological diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004a, 11(4): 699-703.
40. Guan M, Chen HY, Foo SY, Tan YJ, Goh PY, and Wee SH, Recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests for detection of immunoglobulin G antibodies to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus in SARS patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004b, 11(2): 287-91.
41. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JSM, and Poon LLM, Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. *Science*, 2003, 302(5643): 276-278.
42. Gubbins MJ, Plummer FA, Yuan XY, Johnstone D, Drebot M, Andonova M, Andonov A, and Berry JD, Molecular characterization of a panel of murine monoclonal antibodies specific for the SARS-coronavirus. *Mol Immunol*, 2005, 42(1): 125-36.
43. He ML, Zheng B, Peng Y, Peiris JS, Poon LL, Yuen KY, Lin MC, Kung HF, and Guan Y, Inhibition of SARS-associated coronavirus infection and replication by RNA interference. *Jama*, 2003, 290(20): 2665-6.
44. He Q, Chong KH, Chng HH, Leung B, Ling AE, Wei T, Chan SW, Ooi EE, and Kwang J, Development of a Western blot assay for detection of antibodies against coronavirus causing severe acute respiratory syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 417-22.
45. He Q, Manopo I, Lu L, Leung BP, Chng HH, Ling AE, Chee LL, Chan SW, Ooi EE, Sin YL, Ang B, and Kwang J, Novel Immunofluorescence Assay Using Recombinant Nucleocapsid-Spike Fusion Protein as Antigen To Detect Antibodies against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(2): 321-8.
46. He Y, Zhou Y, Liu S, Kou Z, Li W, Farzan M, and Jiang S, Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004a, 324(2): 773-81.
47. He Y, Zhou Y, Wu H, Luo B, Chen J, Li W, and Jiang S, Identification of immunodominant sites on the spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: implication for developing SARS diagnostics and vaccines. *J Immunol*, 2004b, 173(6): 4050-7.

48. He Y, Zhu Q, Liu S, Zhou Y, Yang B, Li J, and Jiang S, Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus: importance for designing SARS vaccines. *Virology*, 2005, 334(1): 74-82.
49. Hofmann H and Pohlmann S, Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol*, 2004, 12(10): 466-72.
50. Holmes KV, SARS-Associated Coronavirus. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348(20): 1948-1951.
51. Hou L, Du G, Tong Y, and Wang H, Identification of B cell epitopes of hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase. *J Virol Methods*, 2002, 104(1): 1-8.
52. Hsu LY, Lee CC, Green JA, Ang B, Paton NI, Lee L, Villacian JS, Lim PL, Earnest A, and Leo YS, Severe acute respiratory syndrome (SARS) in Singapore: clinical features of index patient and initial contacts. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(6): 713-7.
53. Hsueh PR, Hsiao CH, Yeh SH, Wang WK, Chen PJ, Wang JT, Chang SC, Kao CL, and Yang PC, Microbiologic characteristics, serologic responses, and clinical manifestations in severe acute respiratory syndrome, Taiwan. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(9): 1163-7.
54. Hua R, Zhou Y, Wang Y, Hua Y, and Tong G, Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(3): 929-35.
55. Huang LR, Chiu CM, Yeh SH, Huang WH, Hsueh PR, Yang WZ, Yang JY, Su IJ, Chang SC, and Chen PJ, Evaluation of antibody responses against SARS coronaviral nucleocapsid or spike proteins by immunoblotting or ELISA. *J Med Virol*, 2004, 73(3): 338-46.
56. Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, and Ziebuhr J, Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol*, 2004, 78(11): 5619-32.
57. Jameson BA and Wolf H, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci*, 1988, 4(1): 181-6.
58. Jeffers SA, Tusell SM, Gillim-Ross L, Hemmila EM, Achenbach JE, Babcock GJ, Thomas WD, Jr., Thackray LB, Young MD, Mason RJ, Ambrosino DM, Wentworth DE, Demartini JC, and Holmes KV, CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(44): 15748-53.

59. Kim TW, Lee JH, Hung CF, Peng S, Roden R, Wang MC, Viscidi R, Tsai YC, He L, Chen PJ, Boyd DA, and Wu TC, Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2004, 78(9): 4638-45.
60. Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, Paoletti AD, Lane TE, Fitchen JH, Buchmeier MJ, and Beachy RN, 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 U S A*, 1999, 96(14): 7774-9.
61. Koolen MJ, Borst MA, Horzinek MC, and Spaan WJ, 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): 6270-3.
62. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, and Anderson LJ, A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953-66.
63. Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, Ling AE, Chan PK, Tam JS, Zambon MC, Gopal R, Drosten C, van der Werf S, Escriou N, Manuguerra JC, Stohr K, Peiris JS, and Osterhaus AD, Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 362(9380): 263-70.
64. Kyte J and Doolittle RF, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157(1): 105-32.
65. Lau SK, Woo PC, Wong BH, Tsoi HW, Woo GK, Poon RW, Chan KH, Wei WI, Peiris JS, and Yuen KY, Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in sars patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(7): 2884-9.
66. Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, Ahuja A, Yung MY, Leung CB, To KF, Lui SF, Szeto CC, Chung S, and Sung JJ, A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1986-94.
67. Leung DT, Tam FC, Ma CH, Chan PK, Cheung JL, Niu H, Tam JS, and Lim PL, Antibody

- response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis*, 2004, 190(2): 379-86.
68. Lew TW, Kwek TK, Tai D, Earnest A, Loo S, Singh K, Kwan KM, Chan Y, Yim CF, Bek SL, Kor AC, Yap WS, Chelliah YR, Lai YC, and Goh SK, Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *Jama*, 2003, 290(3): 374-80.
69. Li G, Chen X, and Xu A, Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med*, 2003, 349(5): 508-9.
70. Li J, Luo C, Deng Y, Han Y, Tang L, Wang J, Ji J, Ye J, Jiang F, Xu Z, Tong W, Wei W, Zhang Q, Li S, Li W, Li H, Li Y, Dong W, Wang J, Bi S, and Yang H, The structural characterization and antigenicity of the S protein of SARS-CoV. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, 1(2): 108-17.
71. Li S, Lin L, Wang H, Yin J, Ren Y, Zhao Z, Wen J, Zhou C, Zhang X, Li X, Wang J, Zhou Z, Liu J, Shao J, Lei T, Fang J, Xu N, and Liu S, The epitope study on the SARS-CoV nucleocapsid protein. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, 1(3): 198-206.
72. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, and Farzan M, Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426(6965): 450-4.
73. Lin Y, Shen X, Yang RF, Li YX, Ji YY, He YY, Mu DS, Lu W, Shi TL, Wang J, Wang HX, Jiang HL, Sheng JH, Xie YH, Wang Y, Pei G, Shen BF, Wu JR, Sun B, Identification of an epitope of SAR-coronavirus nucleocapsid protein. *Cell Research*, 2003,13(3):141-145.
74. Liu S, Xiao G, Chen Y, He Y, Niu J, Escalante CR, Xiong H, Farmer J, Debnath AK, Tien P, and Jiang S, Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*, 2004, 363(9413): 938-47.
75. Liu X, Shi Y, Li P, Li L, Yi Y, Ma Q, and Cao C, Profile of antibodies to the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in probable SARS patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1): 227-8.
76. Luytjes W, Geerts D, Posthumus W, Melen R, and Spaan W, Amino acid sequence of a conserved neutralizing epitope of murine coronaviruses. *J Virol*, 1989, 63(3): 1408-12.

77. Mahony J, Petrich A, Louie L, Comparison of the cost and performance of seven RT-PCR assays for detecting SARS coronavirus RNA [abstract V-796d]. In: Program and abstracts of the 43rd Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: American Society for Microbiology, **2003**.
78. Manopo I, Lu L, He Q, Chee LL, Chan SW, and Kwang J, Evaluation of a safe and sensitive Spike protein-based immunofluorescence assay for the detection of antibody responses to SARS-CoV. *J Immunol Methods*, 2005, 296(1-2): 37-44.
79. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YSN, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, and Roper RL, The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. *Science*, 2003, 300(5624): 1399-1404.
80. Marshall E and Enserink M, Medicine. Caution urged on SARS vaccines. *Science*, 2004, 303(5660): 944-6.
81. Martina BE, Haagmans BL, Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Peiris JS, Lim W, and Osterhaus AD, Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature*, 2003, 425(6961): 915.
82. Mazzulli T, Farcas GA, Poutanen SM, Willey BM, Low DE, Butany J, Asa SL, and Kain KC, Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in lung tissue. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(1): 20-4.
83. Nie QH, Luo XD, and Hui WL, Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(6): 1139-43.
84. Nie Y, Wang G, Shi X, Zhang H, Qiu Y, He Z, Wang W, Lian G, Yin X, Du L, Ren L, Wang J, He X, Li T, Deng H, and Ding M, Neutralizing antibodies in patients with severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *J Infect Dis*, 2004, 190(6): 1119-26.
85. Olsen CW, A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol*, 1993, 36(1-2): 1-37.

86. Openshaw PJ, Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. Springer Semin Immunopathol, 1995, 17(2-3): 187-201.
87. Ostler T, Davidson W, and Ehl S, Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. Eur J Immunol, 2002, 32(8): 2117-23.
88. Pang H, Liu Y, Han X, Xu Y, Jiang F, Wu D, Kong X, Bartlam M, and Rao Z, Protective humoral responses to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: implications for the design of an effective protein-based vaccine. J. Gen. Virol., 2004, 85(10): 3109-3113.
89. Parker MM and Masters PS, Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three domain structure for the nucleocapsid protein. Virology, 1990, 179(1): 463-8.
90. Parmley SF and Smith GP, Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. Gene, 1988, 73(2): 305-18.
91. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, and Yuen KY, Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet, 2003a, 361(9366): 1319-25.
92. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, and Yuen KY, Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet, 2003b, 361(9371): 1767-72.
93. Peiris JS, Guan Y, and Yuen KY, Severe acute respiratory syndrome. Nat Med, 2004, 10(12 Suppl): S88-97.
94. Poon LL, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y, Lo YM, and Peiris JS, Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. J Clin Virol, 2003, 28(3): 233-8.
95. Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowronski DM, Salit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, and McGeer AJ, Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1995-2005.
96. Qin ED, Zhu QY, Yu M, Fan BC, Chang GH, Si BY, Yang BA, Peng WM, Jang T, Liu BH, Deng

- YQ, Liu H, Zhang Y, Wang CE, Li YQ, Gan Yh, Li XY, Lu FH, Tan G, Cao WC, Yang RF, Wang J, Li W, Wu QF, Li Y, Xu ZY, Lin W, Chen WJ, Chen HT, Cong LJ, Chen F, Deng YJ, Fang L, Huang YQ, Huang XG, Han YJ, Hu JF, Hu W, Ji J, Jiao YZ, Lei M, Li CF, Li GQ, Li ST, Li SL, Li HH, Li WJ, Li DW, Li CJ, Liu J, Liu Y, Lu H, Qi QH, Qin HO, Shi JP, Sun YQ, Tang L, Tong W, Tong ZZ, Tian XJ, Wang J, Wang ZQ, Wang JJ, Xi Y, Xu J, Yang LH, Ye C, Ye J, Zhang B, Zhao XQ, Zhang F, Zhang JG, Zhang ZJ, Zhang HQ, Zhang YL, Liu B, Zeng CQ, Li SG, Gane Ka-Shu W, Tan XH, Liu SQ, Dong W, Wang J, Yu J, Yang HM. A complete sequence and comparative analysis of a SARS-associated virus (Isolate BJ01). *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(10): 941-948
97. Qin L, Xiong B, Luo C, Guo ZM, Hao P, Su J, Nan P, Feng Y, Shi YX, Yu XJ, Luo XM, Chen KX, Shen X, Shen JH, Zou JP, Zhao GP, Shi TL, He WZ, Zhong Y, Jiang HL, and Li YX, Identification of probable genomic packaging signal sequence from SARS-CoV genome by bioinformatics analysis. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 489-96.
98. Ren Y, Zhou Z, Liu J, Lin L, Li S, Wang H, Xia J, Zhao Z, Wen J, Zhou C, Wang J, Yin J, Xu N, and Liu S, A strategy for searching antigenic regions in the SARS-CoV spike protein. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2003, 1(3): 207-15.
99. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen M-h, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TCT, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus ADME, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, and Bellini WJ, Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Science*, 2003, 300(5624): 1394-1399.
100. Ruan YJ, Wei CL, Ee AL, Vega VB, Thoreau H, Su ST, Chia JM, Ng P, Chiu KP, Lim L, Zhang T, Peng CK, Lin EO, Lee NM, Yee SL, Ng LF, Chee RE, Stanton LW, Long PM, and Liu ET, Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet*, 2003, 361(9371): 1779-85.
101. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, third, New York, 1989.
102. Shen X, Xue JH, Yu CY, Luo HB, Qin L, Yu XJ, Chen J, Chen LL, Xiong B, Yue LD, Cai JH, Shen JH, Luo XM, Chen KX, Shi TL, Li YX, Hu GX, and Jiang HL, Small envelope protein E of SARS: cloning, expression, purification, CD determination, and bioinformatics analysis. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 505-11.
103. Shi L, Rui W, Lee M. [Preliminary analysis of the structure and function of SARS putative

- nucleocapsid protein]. <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/sars/html/41.pdf> (accessed June 2003).
104. Shigeta S and Yamase T, Current status of anti-SARS agents. *Antivir Chem Chemother*, 2005, 16(1): 23-31.
105. Smith GP, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-7.
106. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJ, and Gorbalenya AE, 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(5): 991-1004.
107. So LK, Lau AC, Yam LY, Cheung TM, Poon E, Yung RW, and Yuen KY, Development of a standard treatment protocol for severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361(9369): 1615-7.
108. Spiga O, Bernini A, Ciutti A, Chiellini S, Menciassi N, Finetti F, Causarono V, Anselmi F, Prischi F, and Niccolai N, Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(1): 78-83.
109. Stoute JA, Ballou WR, Kolodny N, Deal CD, Wirtz RA, and Lindler LE, Induction of humoral immune response against *Plasmodium falciparum* sporozoites by immunization with a synthetic peptide mimotope whose sequence was derived from screening a filamentous phage epitope library. *Infect Immun*, 1995, 63(3): 934-9.
110. Subbarao K, McAuliffe J, Vogel L, Fahle G, Fischer S, Tatti K, Packard M, Shieh W-J, Zaki S, and Murphy B, Prior Infection and Passive Transfer of Neutralizing Antibody Prevent Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in the Respiratory Tract of Mice. *J. Virol.*, 2004, 78(7): 3572-3577.
111. Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, and Marasco WA, Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(8): 2536-41.
112. Taguchi F, The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. *J Virol*, 1995, 69(11): 7260-3.

113. Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto S-i, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, and Tsunetsugu-Yokota Y, A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int. Immunol.*, 2004, 16(10): 1423-1430.
114. Talbot PJ and Buchmeier MJ, Antigenic variation among murine coronaviruses: evidence for polymorphism on the peplomer glycoprotein, E2. *Virus Res*, 1985, 2(4): 317-28.
115. Talbot PJ, Salmi AA, Knobler RL, and Buchmeier MJ, Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. *Virology*, 1984, 132(2): 250-60.
116. Tan EL, Ooi EE, Lin CY, Tan HC, Ling AE, Lim B, and Stanton LW, Inhibition of SARS coronavirus infection in vitro with clinically approved antiviral drugs. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(4): 581-6.
117. Tan YJ, Goh PY, Fielding BC, Shen S, Chou CF, Fu JL, Leong HN, Leo YS, Ooi EE, Ling AE, Lim SG, and Hong W, Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 362-71.
118. Tang L, Zhu Q, Qin E, Yu M, Ding Z, Shi H, Cheng X, Wang C, Chang G, Zhu Q, Fang F, Chang H, Li S, Zhang X, Chen X, Yu J, Wang J, and Chen Z, Inactivated SARS-CoV vaccine prepared from whole virus induces a high level of neutralizing antibodies in BALB/c mice. *DNA Cell Biol*, 2004, 23(6): 391-4.
119. ter Meulen J, Bakker AB, van den Brink EN, Weverling GJ, Martina BE, Haagmans BL, Kuiken T, de Kruif J, Preiser W, Spaan W, Gelderblom HR, Goudsmit J, and Osterhaus AD, Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2139-41.
120. Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, and Ziebuhr J, Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 9): 2305-15.
121. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, and Lanzavecchia A, An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, 2004, 10(8): 871-5.

122. Tripet B, Howard MW, Jobling M, Holmes RK, Holmes KV, and Hodges RS, Structural Characterization of the SARS-Coronavirus Spike S Fusion Protein Core. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(20): 20836-20849.
123. Tsang K and Zhong NS, SARS: pharmacotherapy. *Respirology*, 2003, 8 Suppl(S25-30).
124. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, and Lai KN, A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1977-85.
125. van den Brink EN, Ter Meulen J, Cox F, Jongeneelen MA, Thijsse A, Throsby M, Marissen WE, Rood PM, Bakker AB, Gelderblom HR, Martina BE, Osterhaus AD, Preiser W, Doerr HW, de Kruif J, and Goudsmit J, Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2005, 79(3): 1635-44.
126. Wang B, Chen H, Jiang X, Zhang M, Wan T, Li N, Zhou X, Wu Y, Yang F, Yu Y, Wang X, Yang R, and Cao X, Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein. *Blood*, 2004, 104(1): 200-6.
127. Wang J, Wen J, Li J, Yin J, Zhu Q, Wang H, Yang Y, Qin E, You B, Li W, Li X, Huang S, Yang R, Zhang X, Yang L, Zhang T, Yin Y, Cui X, Tang X, Wang L, He B, Ma L, Lei T, Zeng C, Fang J, Yu J, Wang J, Yang H, West MB, Bhatnagar A, Lu Y, Xu N, and Liu S, Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin Chem*, 2003, 49(12): 1989-96.
128. Wang P, Chen J, Zheng A, Nie Y, Shi X, Wang W, Wang G, Luo M, Liu H, Tan L, Song X, Wang Z, Yin X, Qu X, Wang X, Qing T, Ding M, and Deng H, Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(2): 439-44.
129. Wang YD, Li Y, Xu GB, Dong XY, Yang XA, Feng ZR, Tian C, and Chen WF, Detection of antibodies against SARS-CoV in serum from SARS-infected donors with ELISA and Western blot. *Clin Immunol*, 2004a, 113(2): 145-50.
130. Wang YD, Sin WY, Xu GB, Yang HH, Wong TY, Pang XW, He XY, Zhang HG, Ng JN, Cheng CS, Yu J, Meng L, Yang RF, Lai ST, Guo ZH, Xie Y, and Chen WF, T-cell epitopes in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein elicit a specific T-cell immune response in patients who recover from SARS. *J Virol*, 2004b, 78(11): 5612-8.

131. Wang Z, Ren L, Zhao X, Hung T, Meng A, Wang J, and Chen YG, Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J Virol*, 2004, 78(14): 7523-7.
132. Weingartl H, Czib M, Czib S, Neufeld J, Marszal P, Gren J, Smith G, Jones S, Proulx R, Deschambault Y, Grudeski E, Andonov A, He R, Li Y, Copps J, Grolla A, Dick D, Berry J, Ganske S, Manning L, and Cao J, Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J Virol*, 2004, 78(22): 12672-6.
133. Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, and Farzan M, 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.
134. Wong VW, Dai D, Wu AK, and Sung JJ, Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*, 2003, 9(3): 199-201.
135. Woo K, Joo M, Narayanan K, Kim KH, and Makino S, Murine coronavirus packaging signal confers packaging to nonviral RNA. *J Virol*, 1997, 71(1): 824-7.
136. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Chan KH, Chu CM, Tsoi HW, Huang Y, Peiris JS, and Yuen KY, Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004a, 11(4): 665-8.
137. Woo PC, Lau SK, Wong BH, Chan KH, Hui WT, Kwan GS, Peiris JS, Couch RB, and Yuen KY, False-positive results in a recombinant severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid enzyme-linked immunosorbent assay due to HCoV-OC43 and HCoV-229E rectified by Western blotting with recombinant SARS-CoV spike polypeptide. *J Clin Microbiol*, 2004b, 42(12): 5885-8.
138. Wu CJ, Jan JT, Chen CM, Hsieh HP, Hwang DR, Liu HW, Liu CY, Huang HW, Chen SC, Hong CF, Lin RK, Chao YS, and Hsu JT, Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2693-6.
139. Wu CY, Jan JT, Ma SH, Kuo CJ, Juan HF, Cheng YS, Hsu HH, Huang HC, Wu D, Brik A, Liang FS, Liu RS, Fang JM, Chen ST, Liang PH, and Wong CH, Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(27): 10012-7.

140. Xiao X, Chakraborti S, Dimitrov AS, Gramatikoff K, and Dimitrov DS, The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(4): 1159-64.
141. Xiong B, Gui CS, Xu XY, Luo C, Chen J, Luo HB, Chen LL, Li GW, Sun T, Yu CY, Yue LD, Duan WH, Shen JK, Qin L, Shi TL, Li YX, Chen KX, Luo XM, Shen X, Shen JH, and Jiang HL, A 3D model of SARS_CoV 3CL proteinase and its inhibitors design by virtual screening. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 497-504.
142. Xiong S, Wang YF, Zhang MY, Liu XJ, Zhang CH, Liu SS, Qian CW, Li JX, Lu JH, Wan ZY, Zheng HY, Yan XG, Meng MJ, and Fan JL, Immunogenicity of SARS inactivated vaccine in BALB/c mice. *Immunol Lett*, 2004, 95(2): 139-43.
143. Yamamoto N, Yang R, Yoshinaka Y, Amari S, Nakano T, Cinatl J, Rabenau H, Doerr HW, Hunsmann G, Otaka A, Tamamura H, Fujii N, and Yamamoto N, HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits replication of SARS-associated coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(3): 719-25.
144. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K, and Nabel GJ, A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*, 2004, 428(6982): 561-4.
145. Yi L, Li Z, Yuan K, Qu X, Chen J, Wang G, Zhang H, Luo H, Zhu L, Jiang P, Chen L, Shen Y, Luo M, Zuo G, Hu J, Duan D, Nie Y, Shi X, Wang W, Han Y, Li T, Liu Y, Ding M, Deng H, and Xu X, Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. *J Virol*, 2004, 78(20): 11334-9.
146. Yu MW, Scott JK, Fournier A, and Talbot PJ, Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides. *Virology*, 2000, 271(1): 182-96.
147. Yu XJ, Luo C, Lin JC, Hao P, He YY, Guo ZM, Qin L, Su J, Liu BS, Huang Y, Nan P, Li CS, Xiong B, Luo XM, Zhao GP, Pei G, Chen KX, Shen X, Shen JH, Zou JP, He WZ, Shi TL, Zhong Y, Jiang HL, and Li YX, Putative hAPN receptor binding sites in SARS_CoV spike protein. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 481-8.
148. Zeng F, Chow KY, Hon CC, Law KM, Yip CW, Chan KH, Peiris JS, and Leung FC, Characterization of humoral responses in mice immunized with plasmid DNAs encoding SARS-CoV spike gene fragments. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4): 1134-9.

149. Zhang H, Wang G, Li J, Nie Y, Shi X, Lian G, Wang W, Yin X, Zhao Y, Qu X, Ding M, and Deng H, Identification of an Antigenic Determinant on the S2 Domain of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein Capable of Inducing Neutralizing Antibodies. *J. Virol.*, 2004, 78(13): 6938-6945.
150. Zhang Y, Li T, Fu L, Yu C, Li Y, Xu X, Wang Y, Ning H, Zhang S, Chen W, Babiuk LA, and Chang Z, Silencing SARS-CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett*, 2004, 560(1-3): 141-6.
151. Zhao JC, Wang W, Wang GF, Li YH, Zhuang H, Xu XY, Ren FR, Zhao ZD, and Gao XM, Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against the spike protein of SARS-coronavirus. *J Clin Virol*, 2005a, 33(1): 12-18.
152. Zhao JC, Zhao ZD, Wang W, and Gao XM, Prokaryotic expression, refolding, and purification of fragment 450-650 of the spike protein of SARS-coronavirus. *Protein Expr Purif*, 2005b, 39(2): 169-74.
153. Zheng BJ, Wong KH, Zhou J, Wong KL, Young BW, Lu LW, and Lee SS, SARS-related virus predating SARS outbreak, Hong Kong. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(2): 176-8.
154. Zhou T, Wang H, Luo D, Rowe T, Wang Z, Hogan RJ, Qiu S, Bunzel RJ, Huang G, Mishra V, Voss TG, Kimberly R, and Luo M, An Exposed Domain in the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Induces Neutralizing Antibodies. *J. Virol.*, 2004, 78(13): 7217-7226.
155. Zhu MS, Pan Y, Chen HQ, Shen Y, Wang XC, Sun YJ, and Tao KH, Induction of SARS-nucleoprotein-specific immune response by use of DNA vaccine. *Immunol Lett*, 2004, 92(3): 237-43.

致 谢

值此论文完稿之际，首先向导师童光志研究员致以最崇高的敬意和最由衷的谢意！特别感谢导师三年来对我的辛勤培养和殷切教诲，以及始终给予我的指导、支持和帮助。导师渊博的学识、严谨的治学态度、一丝不苟的敬业精神、实事求是的工作作风和乐于助人的品德，永远值得我学习。

衷心感谢王云峰副研究员、步志高研究员、吴东来研究员对本实验的关注和提出的有益的建议。感谢科研处的王笑梅研究员、马云燕研究员、张晶老师、孙百明老师的关心和帮助。

对本实验室的仇华吉研究员、周艳君博士、田志军博士研究员、王玫助理研究员、彭金美硕士、姜红女士和赵和老师在实验中的密切合作和无私帮助表示衷心的感谢；同时对在一起学习的孙成群博士、袁秀芳博士、涂亚斌博士、贺云霞博士、刘燕博士、孙惠玲博士、侯绍华博士、周伦江博士、郑宝亮博士、侯艳红博士、闫丽萍博士、安同庆博士、张强博士、李娜博士、李国新硕士、周国辉硕士、王凤雪硕士、王丽丽硕士、杨金雨硕士、刘金霞硕士、侯强硕士、杨春富硕士、李燕硕士、刘益明硕士、王明杰硕士、于斌硕士、鲁山硕士、都兴洋硕士的支持和帮助表示真诚的感谢。

感谢陈化兰研究员，邓国华副研究员，韩凌霞副研究员、刘明副研究员，张云博士在实验和日常生活中给予的支持。

感谢赵宇军博士、李呈军博士、李泽军博士在实验和日常生活中给予的支持。

对仪器室的徐哮老师、王岳老师以及兽医生物技术国家重点实验室各位老师和同学在学习和生活上给予的帮助表示感谢。

感谢中国农业科学院研究生院有关老师的帮助和支持。

借此机会，向我的父母、姐弟，还有我的女友宋永博士表示最深情的谢意！是他们的殷切期望和无私的奉献使我得以完成学业。感谢亲人的理解、支持和鼓励，使我得以全身心投入。

最后，再一次向所有关心、帮助过我的老师、同事和朋友们表示衷心感谢！

本论文的部分研究内容得到了黑龙江省博士后基金的资助，在此表示感谢。

2005 年 6 月 16 日

作者简介

华荣虹,男,1976年8月生,湖北省蕲春县人。1995年9月进入湖北农学院畜牧兽医系学习,1999年6月毕业获农学学士学位;1999年9月进入南京农业大学动物医学院攻读硕士学位,2002年6月毕业获农学硕士学位;2002年9月进入中国农业科学院研究生院、哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室攻读博士学位。在硕士和博士的学习期间,先后参与过国家自然科学基金:bc12基因在鸡马立克氏病发病机理中的作用的研究;鸡的热应激损伤机理研究。江苏省三药科技攻关项目:猪源肠毒素性大肠杆菌菌毛基因多重PCR检测方法的建立及菌毛卵黄抗体的研制。国家自然科学基金:用RNA干扰技术抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的研究。黑龙江省博士后基金:SARS冠状病毒结构蛋白的分析预测及多表位嵌合基因的人工构建及表达,等项目的研究实施工作。硕、博士学习期间在专业期刊已经接受和发表论文14篇,其中SCI收录杂志第一作者论文3篇。

发表文章

1. 华荣虹,童光志 王云峰 周艳君. SARS-CoV S蛋白受体结合结构域的表达及其抗原表位作图. *生物化学与生物物理进展* (SCI, 影响因子 0.241, 已录用).
2. **Rong-Hong Hua**, Yun-Feng Wang, Zhi-Gao Bu, Yan-Jun Zhou, Jin-Ying Ge, Xi-Jun Wang and Guang-Zhi Tong. Identification and epitope mapping of an immunodominant region on S1 domain of SARS-CoV spike protein. *DNA and Cell Biology*. (SCI, 影响因子 2.006, In Press).
3. 周艳君,华荣虹,王云峰,安同庆,刘金霞,杨金雨,华玉卓,童光志. SARS-CoV 单克隆抗体的制备及抗原表位的初步鉴定. *生物工程学报*, 2005, 21(2): 211-215
4. 张书霞,华荣虹,鲍恩东. 热应激对鸡脾脏和法氏囊细胞凋亡的影响及其调节. *中国农业科学*, 2005, 38(1): 176-180
5. **Hua Ronghong**, ZhouYanjun, WangYunfeng, HuaYuzhuo, Tong Guangzhi*. Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319 (3): 929-935. (SCI, 影响因子 2.835)
6. 华荣虹,张书霞,何孔旺. 卵黄抗体对ETEC粘附仔猪小肠上皮细胞的体外抑制作用研究. *畜牧与兽医*, 2004,36(8): 7-10
7. 华荣虹,张书霞,何孔旺,白文霞,张雪寒. 肠毒素性大肠杆菌菌毛对产蛋鸡免疫性的研究. *畜牧与兽医*, 2002, 34(5):7-9

8. 华荣虹, 张书霞. 鸡卵黄抗体在仔猪大肠杆菌性腹泻中的应用. 动物医学进展. 2002, 23(1): 13-15
9. 华荣虹, 张书霞, 何孔旺, 倪艳秀, 杨宗照. 检测987p+肠毒素性大肠埃希氏菌PCR方法的建立. 中国兽医科技, 2002, 32(1):3-5
10. 张书霞, 华荣虹, 鲍恩东. 热应激对鸡胸腺细胞凋亡的影响及其调节机理. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 66-69
11. 张雪寒, 何孔旺, 张书霞, 华荣虹. ETEC 肠毒素基因多重 PCR 检测方法的建立. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(2): 67-70
12. 张素芳, 何孔旺, 贾云, 倪艳秀, 华荣虹, 赵宇军. 猪传染性胃肠炎病毒南京分离株纤突 S 蛋白基因的克隆与序列分析. 动物医学进展. 2003, 24(3): 93-97
13. 陆桂平, 华荣虹, 张书霞, 何孔旺. 检测 K88+肠毒素性大肠杆菌 PCR 方法的建立. 畜牧与兽医, 2002, 34(12):7-9
14. 杨宗照, 华荣虹, 张书霞, 杨奎. 鸭 IgG 三种提取方法的比较实验. 中国兽医科技. 2001, 31(4): 26-27

已提交与准备中文章

1. **Hua Ronghong**, et al. Identification a mimic epitope of the neutralizing monoclonal antibody 2C5. (In preparation).
2. **Hua Ronghong**, et al. Detection antibody against SARS-CoV spike protein based on a recombinant fusion protein. (In preparation).