

DOI:10.13350/j.cjpb.220102

• 论著 •

# 新型冠状病毒 Nsp16 蛋白的原核表达 及多克隆抗体的制备\*

闫硕<sup>1</sup>, 陈柯<sup>2</sup>, 杜昆朋<sup>1</sup>, 郝明宇<sup>1</sup>, 孙钰皓<sup>1</sup>, 徐海山<sup>1</sup>, 李瑞芳<sup>2\*\*</sup>, 伊正君<sup>1\*\*</sup>

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

**【摘要】** 目的 原核表达新型冠状病毒 Nsp16 重组蛋白并制备兔抗 Nsp16 多克隆抗体。方法 通过琼脂糖凝胶电泳对含有 Nsp16 基因的重组质粒进行双酶切鉴定, 并将鉴定后的重组质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞; 通过 IPTG 诱导重组蛋白的表达, 利用镍柱亲和层析法纯化该重组蛋白并进行 Western blot 鉴定; 将鉴定后的目的蛋白与弗氏佐剂以 1:1 的体积比混匀, 乳化后免疫新西兰大白兔, 利用 ELISA 和 Western blot 分别进行多克隆抗体效价的测定及其特异性鉴定。结果 Nsp16 基因重组质粒经双酶切后得到 912 bp 的目的片段, 重组质粒转化大肠埃希菌表达出分子质量单位为 33.3 ku 的重组蛋白, 且主要存在于上清中。用纯化的重组蛋白免疫大白兔, 获得兔抗 Nsp16 特异性多克隆抗体, 且其效价达 1:409 600 以上。结论 重组 Nsp16 蛋白可以在大肠埃希菌中正确表达, 免疫大白兔后获得高效价抗 Nsp16 多克隆抗体, 即具有免疫反应性。为 SARS-CoV-2 Nsp16 蛋白在新型冠状病毒肺炎中的进一步研究奠定了基础。

**【关键词】** 新型冠状病毒; Nsp16 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)01-0005-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1): 5-8.]

## Prokaryotic expression of SARS-CoV-2 Nsp16 protein and preparation of polyclonal antibody

YAN Shuo<sup>1</sup>, CHEN Ke<sup>2</sup>, DU Kun-peng<sup>1</sup>, HAO Ming-yu<sup>1</sup>, SUN Yu-hao<sup>1</sup>, XU Hai-shan<sup>1</sup>, LI Rui-fang<sup>2</sup>, YI Zheng-jun<sup>1</sup> (1 Department of medical laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China; 2: Department of Basic Medicine, Weifang Medical University)

**【Abstract】** **Objective** Novel coronavirus Nsp16 recombinant protein was expressed in prokaryotes and rabbit polyclonal antibody against Nsp16 was prepared. **Methods** The recombinant plasmid containing Nsp16 gene was identified by agarose gel electrophoresis and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. The recombinant protein was induced by IPTG, purified by affinity chromatography with nickel column and identified by Western blot. The identified target protein was mixed with Freund's adjuvant at a volume ratio of 1:1, and then New Zealand white rabbits were immunized after emulsification. ELISA and Western blot were used to determine the titer of polyclonal antibody and its specificity. **Results** The Nsp16 recombinant plasmid was digested with double enzymes to obtain a 912 bp target fragment. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* and expressed 33.3 ku recombinant protein, which mainly existed in supernatant. Rabbit polyclonal antibody against Nsp16 was obtained by immunizing white rabbits with purified recombinant protein, and its titer was more than 1:409 600. **Conclusion** The recombinant Nsp16 protein can be expressed correctly in *E. coli*, and rabbit polyclonal antibody against Nsp16 was characterized by high potency, indicating its immunoreactivity. It laid a foundation for further study of SARS-COV-2 Nsp16 protein in COVID-19.

**【Key words】** SARS-CoV-2; Nsp16 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

\*\*\* 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的一种急性呼吸道疾病, 主要表现为低免疫性和高传播性<sup>[1]</sup>。SARS-CoV-2 是目前发现的第 7 种感染人体的冠状病毒, 具有变异快、宿主广、宿主适应性强等特点<sup>[2]</sup>。SARS-CoV-2 主要有 4 种结构蛋白和 16 种非结构蛋白, 与结构蛋白相比, 其非结构蛋白更保守<sup>[3]</sup>。Nsp16 在 SARS-CoV-2 中高度保守, 基因编码的 2'-O-甲基转移酶通过模仿真核生物的“加帽”过程来逃避宿主的免疫反应, 通过

对不同生物 2'-O-甲基转移酶结构的比较发现冠状病毒 Nsp16 独有的 4 残基插入物会改变结合槽中加帽 RNA 的主链构象, 从而实现对底物的催化, 表明该位

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

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

**【作者简介】** 闫硕(1997-), 男, 山东枣庄人, 硕士。主要研究方向: 分子诊断学。E-mail: 843336172@qq.com

点可作为设计冠状病毒特异性甲基转移酶抑制剂的潜在靶点<sup>[4]</sup>。

本研究通过大肠埃希菌表达系统获得重组新型冠状病毒的 Nsp16 蛋白,纯化后通过免疫动物制备抗 Nsp16 蛋白多克隆抗体,并进行其特异性鉴定与效价检测,为 Nsp16 蛋白在细胞中的功能及分子机制研究奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 实验动物** 雌性新西兰大白兔(体重 2~3 kg)购自潍坊医学院实验动物中心。

**1.2 菌株、质粒及主要试剂** *E. coli* BL21(DE3)为本室保存;HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自 Solarbio 公司;抗 His 的鼠单克隆抗体购自中国武汉 ABchonal 公司;pET28a-Nsp16 重组质粒购自上海海吉浩格生物科技有限公司。

### 2 方 法

**2.1 重组质粒的鉴定** 将重组 pET28a-Nsp16 质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后进行质粒抽提,并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以及酶切鉴定。

**2.2 重组 Nsp16 蛋白的诱导表达与条件优化** 将经鉴定正确的重组 pET28a-Nsp16 质粒采用 42 °C 热击法转化至大肠埃希菌 BL21(DE3),挑取单菌落接种含有卡那霉素的 LB 液体培养基,置 37 °C 震荡过夜培养。将过夜培养物以 1 : 100 的比例接种到 5 mL 现配置的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至 A<sub>600</sub> 值约为 0.6 时取 200  $\mu$ L 菌液于 EP 管中并标记诱导前菌液作为对照组,剩余液体中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37 °C 诱导培养 2 h。制备样品,进行 SDS-PAGE 检测。

在其他条件相同的情况下,向已接种重组大肠埃希菌 BL21 的 LB 液体培养基中分别加入终浓度为 0.1、0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG,37 °C 震荡诱导培养 2 h,取 10  $\mu$ L 样品进行 SDS-PAGE。随后在 16 °C 诱导培养 12 h,25 °C 诱导培养 6.5 h,利用 SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况,筛选最佳 IPTG 浓度及诱导温度。

**2.3 重组 Nsp16 蛋白质的纯化及鉴定** 用 Binding Buffer[1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、0.5 mol/L NaCl、5 mmol/L 咪唑]重悬诱导后的菌液,超声裂解菌体后,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清,用直径为 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤留取上清,采用镍柱亲和层析法通过 Elution Buffer[1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、0.5 mol/L NaCl]梯度洗脱重组 Nsp16 蛋白。取纯化前样品、穿出液以及洗脱液进行 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定。

**2.4 Nsp16 多克隆抗体的制备** 将重组 Nsp16 蛋白与弗氏不完全佐剂以 1 : 1 比例混合进行乳化,皮下注射免疫新西兰大白兔,首次免疫蛋白量为 1 mg/只。2 周后利用弗氏不完全佐剂进行第 1 次加强免疫,每次 500  $\mu$ g/只,每隔 1 周进行 1 次加强免疫。在首次免疫动物前及首次免疫后第 4 周,采新西兰大白兔心脏血,采用 ELISA 法测定血清抗体效价。

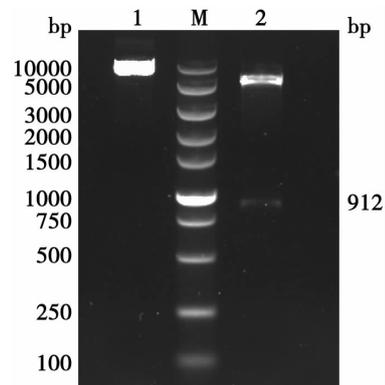
**2.5 兔 Nsp16 多克隆抗体的特异性检测** 将纯化的重组 Nsp16 蛋白进行 SDS-PAGE,转膜后室温封闭 2 h。将免疫后及免疫前兔血清按照 1 : 1 000 的稀释度作为一抗,4 °C 过夜孵育,24 h 后用 TBST 溶液洗去未结合的一抗;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(1 : 6 000)稀释后作为二抗,置于摇床上室温孵育 1 h,用 TBST 溶液洗涤;将 ECL 化学发光液覆盖于 PVDF 膜,进行曝光。

**2.6 Nsp16 多克隆抗体效价的测定** 采用 ELISA 法测定兔血清抗体效价:将纯化重组 Nsp16 蛋白包被 96 孔板,4 °C 孵育过夜后洗涤;37 °C 封闭 2 h,洗涤;加入倍比稀释的兔血清,37 °C 反应 2 h,PBST 溶液洗涤;加入一定稀释度的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,37 °C 孵育 2 h,洗涤;加入四甲基联苯胺(TMB)显色液避光反应,终止显色后测定 A<sub>450</sub> 值。试验设免疫前兔血清作为阴性对照。

## 结 果

### 1 重组表达质粒的双酶切鉴定

重组质粒通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,在 1% 琼脂糖凝胶电泳中出现 912 bp 的 DNA 片段,与预期大小相符(图 1)。



M DNA 标志物 1 重组质粒 2 重组质粒双酶切产物

图 1 重组质粒双酶切鉴定

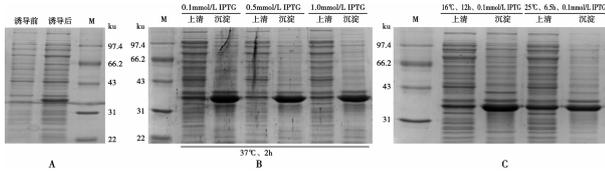
M DNA marker 1 Recombinant plasmid 2 Double enzyme digestion products of recombinant plasmid

Fig. 1 The identification of double enzyme digestion of recombinant plasmid

### 2 重组 Nsp16 蛋白的诱导表达

重组菌在 37 °C 加入 IPTG 诱导 2 h,SDS-PAGE

鉴定出现重组 Nsp16 蛋白(图 2A)。收集分别加入 0.1、0.5、1.0 mmol/L 的 IPTG、37 °C 诱导 2 h 的工程菌进行 SDS-PAGE, 结果如图 2B; 收集加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 后, 分别在 16 °C 及 25 °C 条件下培养 12 h 和 6.5 h 的工程菌, 进行 SDS-PAGE, 结果如图 2C。



A 重组 Nsp16 蛋白的表达 B 重组 Nsp16 蛋白 IPTG 诱导浓度的优化 C 重组 Nsp16 蛋白诱导时间的优化

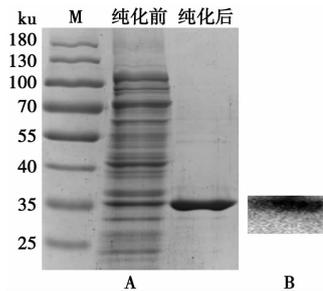
图 2 重组 Nsp16 蛋白表达及诱导条件优化的 SDS-PAGE 分析

A The expression of recombinant Nsp16 protein B Optimization of IPTG induction concentration of recombinant Nsp16 protein C Optimization of induction time of recombinant Nsp16 protein

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression and optimization of recombinant Nsp16 protein

### 3 纯化重组 Nsp16 蛋白的 SDS-PAGE 分析与 Western blot 鉴定

对采用镍柱亲和和层析法纯化得到的蛋白进行 SDS-PAGE(图 3A), 单一蛋白条带位于 33.3 ku 处, 无明显杂带, 纯度良好。使用带有 His 标签单克隆抗体进行 Western blot 鉴定(图 3B), 目的蛋白能被该抗体识别, 证明表达蛋白条带为带有 His 标签的 Nsp16 重组蛋白。



A 纯化重组 Nsp16 蛋白的 SDS-PAGE 分析 B 重组 Nsp16 蛋白的 Western blot 鉴定

图 3 重组 Nsp16 蛋白的纯化与鉴定

A SDS-PAGE analysis of purified of recombinant Nsp16 protein B Western blot identification of recombinant Nsp16 protein  
Fig. 3 Purification and identification of recombinant Nsp16 protein

### 4 兔抗重组 Nsp16 蛋白抗体的 Western blot 鉴定及效价分析

用纯化的重组 Nsp16 蛋白免疫新西兰大白兔, 将免疫后的兔血清与纯化的重组 Nsp16 蛋白进行 Western blot 检测(图 4), 对照显示免疫后兔血清在重组 Nsp16 蛋白分子质量的位置出现反应条带, 而免疫前兔血清无此条带呈现。利用间接 ELISA 方法检测免疫兔血清抗体效价为 1 : 409 600(图 5)。

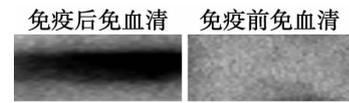


图 4 兔抗重组 Nsp16 蛋白抗体的 Western blot 鉴定  
Fig. 4 Western blot identification of rabbit polyclonal antibodies against recombinant Nsp16 protein

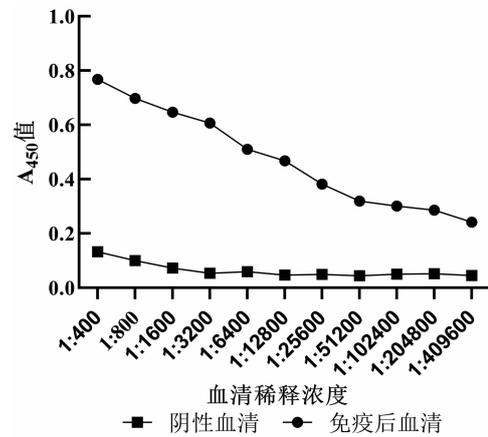


图 5 兔抗重组 Nsp16 蛋白抗体效价测定  
Fig. 5 Determination of titer of rabbit polyclonal antibodies against recombinant Nsp16 protein

## 讨论

新型冠状病毒肺炎传染性强<sup>[5]</sup>, 传播速度快<sup>[6]</sup>。据 WHO 统计, 截至 2021 年 7 月 15 日, 全球 COVID-19 确诊人数为 187 827 660, 其中死亡病例 4 055 497<sup>[7]</sup>。为了应对新型冠状病毒引发的重大疫情, 目前已研发多种类型的新型冠状病毒疫苗, 这些疫苗类型包括病毒载体疫苗、灭活疫苗、减毒活疫苗、重组蛋白疫苗、DNA 疫苗、mRNA 疫苗<sup>[8-9]</sup>。SARS-CoV-2 疫苗为单股正链 RNA 病毒, 单链结构易发生突变且已出现了多个 SARS-CoV-2 突变株<sup>[10]</sup>, 突变株的出现增加了疫情防控工作的难度。SARS-CoV-2 基因组编码 4 种结构蛋白和 16 种非结构蛋白<sup>[11]</sup>。与其结构蛋白相比, 非结构蛋白更保守, Nsp16 基因可编码产生 2'-O-甲基转移酶, 该酶对病毒 RNA 帽的形成以及维持病毒 RNA 稳定性有重要作用。

真核宿主细胞利用在其 mRNA 5' 末端的“加帽”机制来区分自身和外来的 RNA, 并启动自身的免疫反应, 冠状病毒在侵入宿主过程中, 已经进化出多种抵抗宿主免疫系统的机制, 其模仿真核宿主细胞的“加帽”过程已成为冠状病毒逃避宿主免疫识别及保护自身 RNA 不被降解的重要手段之一。Nsp16 蛋白具有 2'-O-甲基转移酶的活性, 在病毒基因模仿人类基因, 形成“帽子”结构的过程中发挥不可或缺的作用<sup>[12]</sup>。在 cap-0 形成的基础上, Nsp16 发挥 2'-O-甲基转移酶的活性, 促进在第 1 个被转录核苷酸的核糖的 2'-O 位甲

基化<sup>[13]</sup>,从而进一步修饰病毒 RNA 的“帽子”结构以帮助病毒逃避宿主的免疫反应。

本研究利用原核表达系统,通过优化诱导温度和诱导剂浓度的方法,成功在上清中获得较高产量的蛋白,并经镍柱亲和层析法纯化得到高纯度的重组 Nsp16 蛋白。用 Western blot 鉴定后的目的蛋白免疫新西兰大白兔,制备了多克隆抗体,经间接 ELISA 检测其效价为 1 : 409 600。Western blot 检测该多克隆抗体具有良好的免疫反应性。

目前,对 Nsp16 蛋白结构构象的了解还有待深入<sup>[14]</sup>。本研究成功表达了重组 Nsp16 蛋白,并且制备了针对该蛋白的多克隆抗体。该抗体效价高具有免疫反应性,可为 SARS-CoV-2 疫苗的研发提供理论基础。

【参考文献】

[1] 李沛霖,刘海英. SARS-CoV-2 入侵细胞相关分子结构与机制的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(3): 337-345.

[2] 鹿振辉,张顺先. 新型冠状病毒的病原学和流行特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(5): 416-419.

[3] 刘彬,秦照玲,戚中田. 新型冠状病毒基因组结构与蛋白功能[J]. 微生物与感染, 2020, 15(1): 52-57.

[4] Minasov G, Rosas-Lemus M, Shuvalova L, et al. Mn<sup>2+</sup> coordinates Cap-0-RNA to align substrates for efficient 2'-O-methyl transfer by SARS-CoV-2 nsp16[J]. Sci Signal, 2021, 14(689): eabh2071.

[5] 中华预防医学会新型冠状病毒肺炎防控专家组. 新型冠状病毒肺炎

流行病学特征的最新认识[J]. 中国病毒病杂志, 2020, 10(2): 86-92.

[6] Harapan H, Itoh N, Yufika A, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review [J]. Infect Public Health, 2020, 13(5): 667-673.

[7] World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. [2021-7-15]. <https://covid19.who.int>.

[8] 李珊珊,顾静文,张菁,等. 现行新型冠状病毒疫苗的临床试验进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(5): 321-329.

[9] 王璐,范俊平,徐燕,等. 新型冠状病毒疫苗的研发现状与挑战[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(5): 492-496.

[10] 于永利. 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 的突变株及其疫苗[J/OL]. 微生物学免疫学进展, 2021(3): 1-4.

[11] Morales P, Curtis N, Zárate S, et al. Interfering with mRNA Methylation by the 2' O-Methyltransferase (NSP16) from SARS-CoV-2 to Tackle the COVID-19 Disease[J]. Catalysts, 2020, 10(9): 1023.

[12] Chang LJ, Chen TH. NSP16 2'-O-MTase in coronavirus pathogenesis: possible prevention and treatments strategies[J]. Viruses, 2021, 13(4): 538.

[13] Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, et al. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: rna synthesis, proof-reading and final capping[J]. Cells, 2020, 9(5): 1267.

[14] Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential[J]. Biophys, 2021, 120(14): 2880-2889.

【收稿日期】 2021-10-09 【修回日期】 2021-12-15

(上接 4 页)

综上所述,含有 RBD-EPI 序列的 pVAX-RBD-EPI 核酸疫苗诱导小鼠产生了针对 COVID-19 的特异性抗体,PIKCA 佐剂可使 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 核酸疫苗的免疫效果增强,但关于该佐剂疫苗用于 SARS-CoV-2 的预防效果有待于进一步研究。

【参考文献】

[1] WHO. 新冠病毒被命名为 SARS-CoV-2,疾病名称为 COVID-19 [J]. 中国医学计算机成像杂志, 2020, 26(1): 38.

[2] 吕亚兰,刘聪,周文正,等. 新型冠状病毒肺炎与 SARS、MERS 的流行病学特征与防控措施比较[J]. 医药导报, 2020, 39(3): 334-337.

[3] 赵文明,宋述慧,陈梅丽,等. 2019 新型冠状病毒信息库[J]. 遗传, 2020, 42(2): 212-221.

[4] 梁育玮,赖玲玲,王航. 新型冠状病毒致病机理及其疫苗的研发进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(4): 68-73.

[5] 杨吕,何庆. 血管紧张素转换酶 2 在新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 发病机制及治疗中的作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(8): 575-583.

[6] 张竞文,胡欣,金鹏飞. 新型冠状病毒引起的细胞因子风暴及其药物治疗[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(5): 333-336.

[7] 刘千勇,王晓良. 新型冠状病毒(2019-nCoV)的靶向药物研究策略[J]. 药理学学报, 2020, 55(2): 181-188.

[8] 鲁荣光,武婧,白雪,等. 新冠病毒 SARS-CoV-2 的感染机制研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(5): 927-935.

[9] Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-ospina E, et al. A global database of COVID-19 vaccinations [J]. Nat Hum Behav, 2021, 5(7): 947-953.

[10] 陈静,李波,申硕,等. COVID-19 疫苗的研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(4): 685-691.

[11] 桓瑜,毕玉海. 2019 新型冠状病毒疫苗研究进展及展望[J/OL]. 中国科学:生命科学: 1-12[2021-06-27].

[12] 付钰倩,芦增增,黄妙惠. 新型冠状病毒肺炎免疫反应与疫苗开发的研究进展[J]. 福建轻纺, 2021(6): 2-7, 12.

[13] 钱汐晶,万彩虹,赵平,等. 新型冠状病毒疫苗研究进展[J/OL]. 解放军医学杂志: 1-12[2021-06-27].

[14] 金翔,俞庆龄,张璐楠,等. 针对新型冠状病毒的 DNA 疫苗研究进展[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(21): 2425-2433.

[15] 迟航. MERS DNA 疫苗和重组狂犬病病毒载体疫苗的构建与实验免疫研究[D]. 长春:军事科学院, 2018.

[16] Yu J, Tostanoski LH, Peter L, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques [J]. Science, 2020, 369(6505): 806-811.

[17] Brocato RL, Kwilas SA, Kim RK, et al. Protective efficacy of a SARS-CoV-2 DNA vaccine in wild-type and immunosuppressed Syrian hamsters [J]. NPJ Vaccines, 2021, 6(1): 16.

【收稿日期】 2021-10-13 【修回日期】 2021-12-26