

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/63

C12N 15/70 C12N 15/50



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03129148.1

[43] 公开日 2004 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 1468962A

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03129148.1

[71] 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区祖  
冲之路 555 号

共同申请人 中国科学院上海生命科学研究院  
上海先导药业有限公司

[72] 发明人 沈旭 蒋华良 胡庚熙 陈莉莉  
孙涛 沈建华 罗小民 陈凯先  
庄贤韩

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

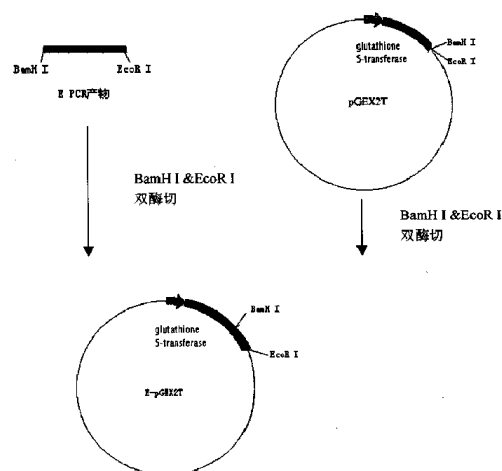
代理人 楼仙英

权利要求书 4 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称 可溶性 SARS 病毒小信封蛋白的表达和纯化

[57] 摘要

本发明提供可在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的表达质粒 pGEX2T-E, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏日 2003 年 5 月 30 日, 保藏号 M203047。还提供在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的方法, 包括: 采用 PCR 技术从 SARS 病毒 cDNA 文库中获得 SARS 病毒 E 蛋白 DNA 片段(TRO2); 用 pGEX2T 载体构建 SARS 病毒 E 蛋白表达质粒 pGEX2T-E; 和将 pGEX2T-E 质粒转化于宿主细胞中, 并在宿主细胞中表达。可溶性 SARS 病毒 E 蛋白表达产物的纯化方法, 包括将细胞裂解液透析、Glutathione Sepharose 4B 柱层析和分子筛纯化。本发明的方法操作简单、得到的蛋白纯度高。



1. 可在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的表达质粒，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏日 2003 年 5 月 30 日，保藏号 M203047。

5 2. 如权利要求 1 所述的表达质粒，含有如下序列：

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGG  
CTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTGCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTT  
TTTTGCGCCGACATCATAACGGTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGG  
CTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTA  
10 TACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGA  
AAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATT  
GGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCAT  
CATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTC  
AATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT  
15 GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTTTAT  
GTCATAAAACATAITTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGAT  
GTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTAT  
TGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGC  
TGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCATG  
20 **TACTCATTGTTTTCGGAAGAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTTCGTG**  
**GIATTCCTGCTAGTCACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTT**  
**AACGTGAGTTTAGTAAAACCAACGGTTTACGTCTACTCGCGTGTTAAAAATCTGAACTCTTCTGAAGG**  
**AGTTCCTGATCTTCTGGTCTAAGAATTCATCGTGA****CTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGGTTTCGGT**  
GATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA  
25 TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCC  
ATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGC  
CTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA  
TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA  
ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCC  
30 CTTATCCCTTTTTTGCGGCATTGTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA

AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA  
TCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG  
CGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAAT  
GACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA  
5 TGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA  
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACGCTTGATCGTTGGGAA  
CCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAAC  
AACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG  
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT  
10 GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG  
CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG  
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT  
TTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCAT  
GACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG  
15 ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCA  
GCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGA  
GCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG  
CACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG  
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGG  
20 GTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG  
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT  
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG  
GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA  
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT  
25 TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC  
GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTA  
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAAATTCCGACACCATCGAATGGTGCAAA  
ACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCA  
GTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACC  
30 AGGCCAGCCACGTTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTA

CATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTC  
 CAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGG  
 TGCCAGCGTGGTGGTGTTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACA  
 ATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGC  
 5 TGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTAATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAAC  
 AGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACC  
 AGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGC  
 ATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGT  
 CCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCA  
 10 ACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGC GGATA  
 TCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAA  
 ACAGGATTTTCGCTGTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGG  
 CGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAAT  
 ACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA  
 15 CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC  
 TTACTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA  
 AACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC  
 TGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA  
 GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTT  
 20 TCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACTGTTCG  
 TCGTCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCAT  
 TACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACCGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTT  
 GATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTGGAATT

- 25 3. 一种用权利要求 1 所述表达质粒 pGEX2T-E 转化的宿主细胞。
4. 如权利要求 3 所述的宿主细胞, 所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。
5. 如权利要求 4 所述的宿主细胞, 所述宿主细胞为大肠杆菌。
6. 在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的方法, 包括以下步骤:
- 1) 用 PCR 技术从 SARS 病毒 cDNA 文库中获得 SARS 病毒 E 蛋白 DNA 片段;
- 30 2) 用 pGEX2T 载体构建 SARS 病毒 E 蛋白表达质粒 pGEX2T;

3) 将 pGEX2T 质粒转化于宿主细胞中,并在宿主细胞中表达。

7.可溶性 SARS 病毒 E 蛋白表达产物的纯化方法,包括将细胞裂解液透析、Glutathione Sepharose 4B 柱层析和分子筛纯化。

## 可溶性 SARS 病毒小信封蛋白的表达和纯化

### 5 技术领域

本发明涉及分子和细胞生物学研究领域，具体涉及在宿主细胞中可溶性 SARS 病毒小信封蛋白 (SARS small envelope E protein) 的表达和纯化。

### 10 背景技术

自 2002 年底至 2003 年初，一种被称为“非典型肺炎 (severe acute respiratory syndrome, SARS)”的病例在我国广东省被首次发现，随后在世界 30 多个国家和地区爆发，SARS 在我国内地的北京、山西、内蒙等 25 个省市自治区“肆意横行”，对我国人民群众的生命财产构成严重威胁。SARS 是一种传染性强、生存强、致死率高的新型病毒，截止到 2003 年 5 月 19 日，全球  
15 累计报告病例已达 7864 人，死亡病例 643 人。SARS 已被世界公认为人类的共同敌人。SARS 爆发后，引起了各国政府和研究机构的高度重视，世界卫生组织 (WHO) 已派遣技术人员前往疫区指导防治工作，各国科研人员紧密合作，共同寻找 SARS 的病原体和防治方法。经过多国科研人员的努力，终于发现 SARS 冠状病毒 (coronavirus) 是 SARS 感染、病人发病和致死的元凶。SARS 病毒的全基因组已分别被加拿大、美国和中国的科学家测定，这对于研究 SARS 病毒  
20 的致病机理以设计抗 SARS 药物具有重要意义。

SARS 冠状病毒 (SARS—Cov) 属于巢状病毒目 (Order: Nidovirales)，冠状病毒科 (Family: Coronaviridae)，冠状病毒属 (Genus: Coronavirus)。根据其基因组结构分类，它属于单链正义病毒 [(+) sense, ssRNA virus]，对其  
25 它已知冠状病毒的研究发现，其病毒包膜 (envelop) 主要包括三种糖蛋白，分别命名为 S 蛋白 (Spike Protein)、M 蛋白 (Membrane Protein)、E 蛋白 (Envelope Protein)。在部分病毒株中还能找到一种 HE 蛋白 (Haemagglutinin)

—esterase)。其中 E 蛋白是一种相对较小的蛋白质，主要分布于病毒包膜上。SARS 病毒的 E 蛋白是最小的结构蛋白，仅有 76 个氨基酸。它的氨基酸序列如下：  
MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLVTLAILTALRLCAYCCNIVNLSLVKPTVYVYSRVKNLNS  
SEGVPDLLV。

5 和其它冠状病毒一致，SARS—CoV E 蛋白包含一个疏水段（残基 12—37）其侧面是带电的残基，而接着是半胱氨酸富集的区域。应用生物信息学分析工具 BLAST 和 FASTA 分析显示 E 蛋白与其它冠状病毒的 E（Envelop）蛋白显著的匹配。PFAM 分析揭示 SARS 的 E 蛋白较好地表现了 NS3\_EnvE 蛋白家族中一员的特性。InterProScan 分析显示 E 蛋白是病毒包膜（Envelop）的组成部分，保守的序列  
10 在其它病毒中也发现，如肠胃炎病毒（gastroenteritis）和鼠肝炎病毒（murine hepatitis）。SignalP 分析预计它含有一个跨膜的锚（transmembrane anchor）（可能性达 0.939）。TmPred 分析显示 SARS 的 E 蛋白含有与其它已知病毒包膜上的这种蛋白类似的跨膜段，位于残基 17—34 间。TMHMM 分析预计一种由大部分的亲水（hydrophilic domain）段（46 个残基）组成的 II 型的膜蛋白（a type II  
15 membrane protein）和碳末端位于病毒颗粒的表面。

对其它冠状病毒 E 蛋白功能研究结果也许能对 SARS 病毒 E 蛋白的功能认识有所帮助和指导。一般研究都认为冠状病毒的 E 蛋白和 M 蛋白对病毒颗粒的组装是必需和充分的。为认识鼠肝炎病毒（MHV）E 蛋白的作用，有人将其中 E 蛋白的带电残基进行了丙氨酸突变，突变的病毒显示出温度敏感型，即使在适合的温  
20 度下绝大部分突变病毒的形态也变得紧缩拉长，无法形成正常的野生型（wild-type），可见 E 蛋白在冠状病毒的形态形成中起了重要的甚至是关键的作用。也有研究显示一些冠状病毒如可遗传的肠胃炎冠状病毒（TGEV）的 E 蛋白是病毒复制所必需的。还有试验显示，在鼠肝炎病毒（MHV）感染的 DBT 细胞中 E 蛋白的表达还会导致 DBT 细胞的凋亡，而 S 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白的表达却不  
25 会导致细胞的凋亡。最近研究表明，虽然去除 E 基因使鼠肝炎病毒（MHV）的复制速度降低了一万倍，但是病毒仍然可以复制，这提示 E 蛋白在病毒复制中起

着重要作用，但也许不是病毒复制的本质因素。

因此，在体外大量表达和纯化可溶性 SARS 病毒 E 蛋白以进一步探索其重要的生物学功能将具有重要的理论和现实意义。本发明者经过反复实验利用实验过程中所积累的独特相关技术经验，在大肠杆菌中成功表达和纯化了可溶性 SARS 病毒 E 蛋白，从而完成了本发明。

本发明的一个目的是提供能够在宿主细胞中表达 SARS 病毒 E 蛋白的表达质粒；

本发明的另一个目的是提供可溶性 SARS 病毒 E 蛋白在宿主细胞中表达和纯化的方法。

10

### 发明内容

本发明的一个方面提供可在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的表达质粒 pGEX2T-E，保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)，分类名称为大肠杆菌 M15/pGEX2T-SARS-E，保藏日 2003 年 5 月 30 日，保藏号 CCTCC No. M203047。

本发明的另一个方面提供用质粒 pGEX2T-E 转化的宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。

本发明的再一个方面提供在宿主细胞中表达可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的方法，包括以下步骤：

- 1) 采用 PCR 技术从 SARS 病毒 cDNA 文库中获得 SARS 病毒 E 蛋白 DNA 片段 (TRO2)；
- 2) 用 pGEX2T 载体构建 SARS 病毒 E 蛋白表达质粒 pGEX2T-E；
- 3) 将 pGEX2T-E 质粒转化于宿主细胞中，并在宿主细胞中表达。

本发明的还有一个方面提供可溶性 SARS 病毒 E 蛋白表达产物的纯化方法，包括细胞裂解、裂解液透析、Glutathione Sepharose 4B 柱层析和分子筛纯化。

### 附图的简单说明

图 1 所示为可溶性 SARS 病毒 E 蛋白表达质粒(pGEX2T-E)构建示意图。



图 2 所示为 SARS 病毒 E 蛋白 PCR 产物 DNA 琼脂糖电泳分析图谱。

图 3 所示为 pGEX2T-E 测序报告。

图 4 所示为 SARS 病毒 E 蛋白纯化产物聚丙烯酰胺电泳分析图谱。图中，  
1. Glutathione Sepharose 4B 柱上的 GST-E； 2. 凝血酶酶切后柱上留有的  
5 GST； 3. 凝血酶酶切后洗脱后并 FPLC 纯化后的 E 蛋白； 4. 标记物 (Marker)。

### 具体实施方式

试验材料：

pQE30 载体, 大肠杆菌菌株 M15 由本室保存。各种限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA  
10 连接酶、高保真 DNA 聚合酶等工具酶购自 TaKaRa 公司。DNA 标记物, 蛋白质  
标记物购自 Invitrogen 公司。IPTG, 氨苄西林和卡那霉素购自 Sigma 公司。  
胶回收试剂盒购自华舜公司。

#### 实施例 1 SARS 病毒 E 蛋白表达质粒 (pGEX2T-E) 的构建

15 利用 PCR 技术从 SARS 病毒 cDNA 文库中获得 SARS 病毒 E 蛋白 DNA  
片段 (基因序列依据 TRO2), 按图 1 所示, 构建表达可溶性的 SARS 病毒 E  
蛋白的表达质粒 (pGEX2T-E)。

1) 设计引物, 扩增 E 蛋白的序列

引物序列:

20 FW: 5'ATTAGGATCC ATGTACTCATTCGTTTCG3'

RV: 5'TTAAGAATTCTTAGGACCAGAAGATCAGG 3'

PCR 扩增反应 (100 $\mu$ l):

模板: 2 $\mu$ l; 10 $\times$ Pyrobest<sup>TM</sup> buffer: 10 $\mu$ l; dNTP(2.5mM): 8 $\mu$ l; FW: 4 $\mu$ l;

RV: 4 $\mu$ l; 高保真 DNA 聚合酶 (pyrobest DNA polymerase): 1 $\mu$ l; 水: 71 $\mu$ l。

25 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 8 分钟;

(95 $^{\circ}$ C 30 秒; 60 $^{\circ}$ C 30 秒; 72 $^{\circ}$ C 30 秒) 30 循环;

72 $^{\circ}$ C 10 分钟。

图 2 所示为 SARS 病毒 E 蛋白 PCR 产物 DNA 琼脂糖电泳分析图谱。

## 2) 将 E 蛋白的 PCR 产物克隆到 pGEX2T 载体上

E 蛋白的 PCR 产物和 pGEX2T 分别用 BamH I 和 EcoR I 酶切（实验方法参照《分子克隆实验指南》，科学出版社，1999 年第二版）；用试剂盒（华舜公司）回收酶切产物（回收 E 的 PCR 酶切产物近 250bp；pGEX2T 酶切产物近 4.9kb）；用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接；连接产物转化入感受态细胞 BL21(DE3)；挑选正确的克隆（酶切鉴定）。

酶切鉴定（实验方法参照《分子克隆实验指南》，科学出版社，1999 年第二版）：BamHI & EcoRI 酶切鉴定，切出 228 条带的克隆是正确的。

10

DNA 测序报告：pGEX2T-E 表达载体测序报告如图 3 所示，pGEX2T-E DNA 测序结果和 E 蛋白原 DNA 序列比较，结果完全一致。

## 实施例 2 可溶性 SARS 病毒 E 蛋白的表达

15 将 pGEX2T-E 质粒转化于大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，IPTG（浓度 0.2 mM）诱导，氨苄西林为抗生素，温度 18°C，表达时间 6 小时。在上述表达条件下，6 升 LB 培养基经 4°C、4000rpm 离心 30 分钟后，将得到的 10 克细菌沉淀物以每份 3 克分装，-80°C 保存。

## 20 实施例 3 表达产物的纯化

在 4°C 下，将 3 克细菌沉淀物悬浮于 15mL 裂解缓冲溶液（50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1mM DDT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF）中，超声波破碎（超声强度 200~300W；超声环境：冰水混合物；总超声时间 15 分钟，每超声 1.5 分钟，间隙 1 分钟）。经 4°C、15,000rpm 超速离心 1 小时后，弃去沉淀物。将得到的 14mL 上清液在 4°C 下透析（透析缓冲液：PBS, 1mM DDT, 5 mM EDTA, pH 7.4）过夜后，用 Glutathione Sepharose 4B 柱（Pharmacia 公司产品）纯化蛋白，其中：洗涤缓冲液为含 1mM DDT、5 mM EDTA 的 PBS (pH 7.4)；酶切体系为 PBS+ 80 单位 凝血酶；E 蛋白洗脱缓冲液为含 1mM DDT、5 mM EDTA 的 PBS (pH 7.4)；GST 洗脱缓冲液为含 50mM 还原性谷胱甘肽的 50 mM Tris

-HCl (pH 8.0)。将得到的 10 mL 蛋白粗提物经蛋白纯化系统 FPLC (Pharmacia 公司产品) 分子筛进一步纯化得到纯 SARS 病毒 E 蛋白 (如图 4 所示)。

### 产业上利用的可能性

- 5 利用本发明可在宿主细胞中获得大量的可溶性 SARS 病毒 E 蛋白 (如, 在大肠杆菌中, 每升 LB 培养基可生产 10 毫克 E 蛋白), 利用 Glutathione Sepharose 4B 柱层析和分子筛提纯方法即可得到纯化的蛋白。本发明具有操作简单、蛋白纯度高等特点。

利用本发明得到的 SARS 病毒 E 蛋白可用于:

- 10 1) 结构生物学方面的研究

A. 培养 SARS 病毒 E 蛋白晶体, 通过 X-射线晶体衍射技术解析 SARS 病毒 E 蛋白晶体结构;

B. 开展 NMR 研究, 以探求 SARS 病毒 E 蛋白溶液状态下的三维结构。

- 2) 与人体重要蛋白相互作用研究

- 15 利用本发明得到的 SARS 病毒 E 蛋白以及生物物理技术可开展与人体重要蛋白 (如免疫系统) 相互作用研究, 以探索 SARS 病毒感染人体正常细胞的途径, 为抗 SARS 药物设计提供依据。

- 3) SARS 诊断抗体研究

- 20 利用本发明得到的 SARS 病毒 E 蛋白与其他生物工程技术相结合, 可开展 SARS 诊断抗体研究。

### 序列表

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGG  
 CTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTT  
 TTTTGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGG  
 5 CTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATTCATGTCCCCTA  
 TACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGA  
 AAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATT  
 GGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCAT  
 CATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTT  
 10 AATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT  
 GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTTTAT  
 GTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGAT  
 GTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTAT  
 TGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGC  
 15 TGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCATG  
 TACTCATTGTTTTCGGAAGAAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCTGTG  
 GIATTCCTGCTAGTCACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTT  
 AACGTGAGTTTAGTAAAAACCAACGGTTTACGTCTACTCGCGTGTTAAAAATCTGAACTCTTCTGAAGG  
 AGTTCTGATCTTCTGGTCTAAGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGT  
 20 GATGACGGTGA AACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA  
 TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCC  
 ATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGC  
 CTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAA  
 TGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA  
 25 ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC  
 CTIATCCCTTTTTTGCGGCATTGTCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA  
 AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA  
 TCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG  
 CGCGGIATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAT  
 30 GACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA

TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA  
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAA  
CCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAAC  
AACGTTGCGCAAAC TATTAAC TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGG  
5 ATGGAGGCGGATAAA GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT  
GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG  
CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG  
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT  
TTAGATTGATTTAAA ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCAT  
10 GACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG  
ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCA  
GCGGTGGTTTTGTTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGA  
GCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG  
CACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG  
15 TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGG  
GTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG  
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT  
CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTG  
GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA  
20 AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT  
TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC  
GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTA  
TTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATAAATCCGACACCATCGAATGGTGCAA  
ACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCA  
25 GTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCC GCGTGGTGAACC  
AGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTA  
CATTCCCAACCGCGTGGCACAACA ACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTC  
CAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTGCGGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGG  
TGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACA  
30 ATCTTCTCGCGCAACGCGTCA GTGGGCTGATCATTA ACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGC

TGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAAC  
AGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCACC  
AGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGC  
ATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGT  
5 CCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCA  
ACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATA  
TCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAA  
ACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGG  
CGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCCAAT  
10 ACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGA  
CTGAAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC  
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA  
AACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC  
TGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA  
15 GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTT  
TCCGGCACCCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTGCG  
TCGTCCCCCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCAT  
TACGGTCAATCCGCCGTTTGTCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTT  
GATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTGGAATT

20

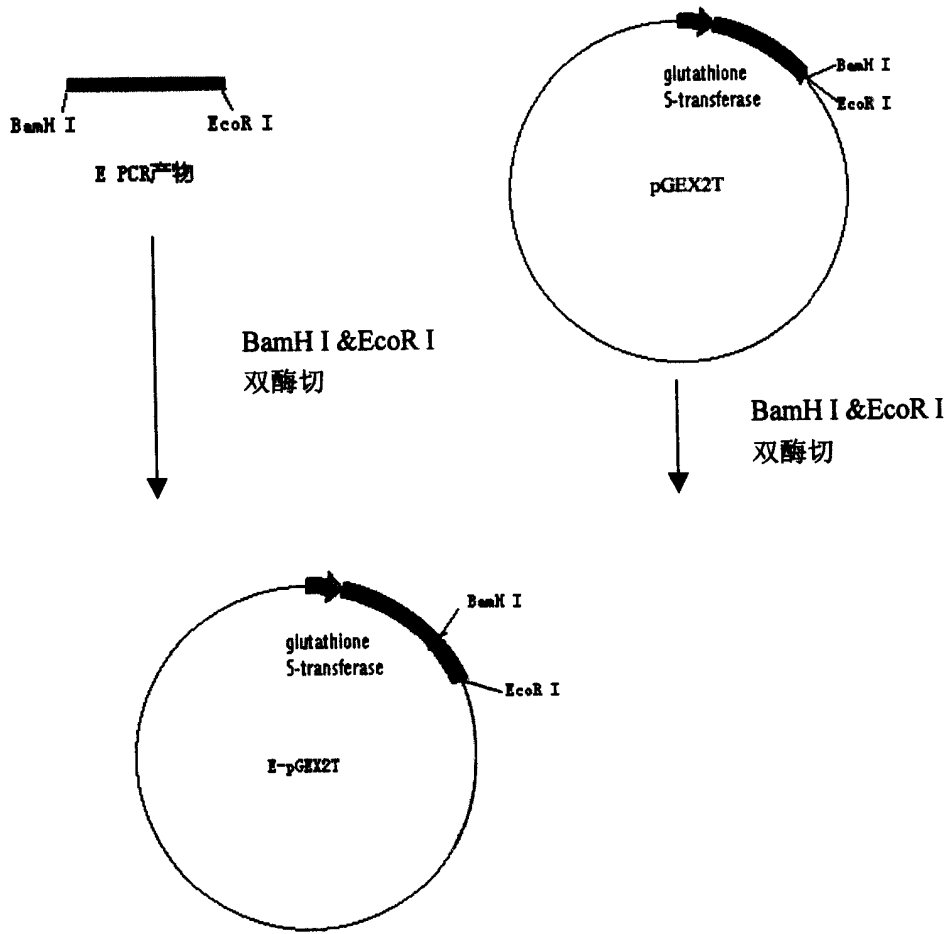


图 1

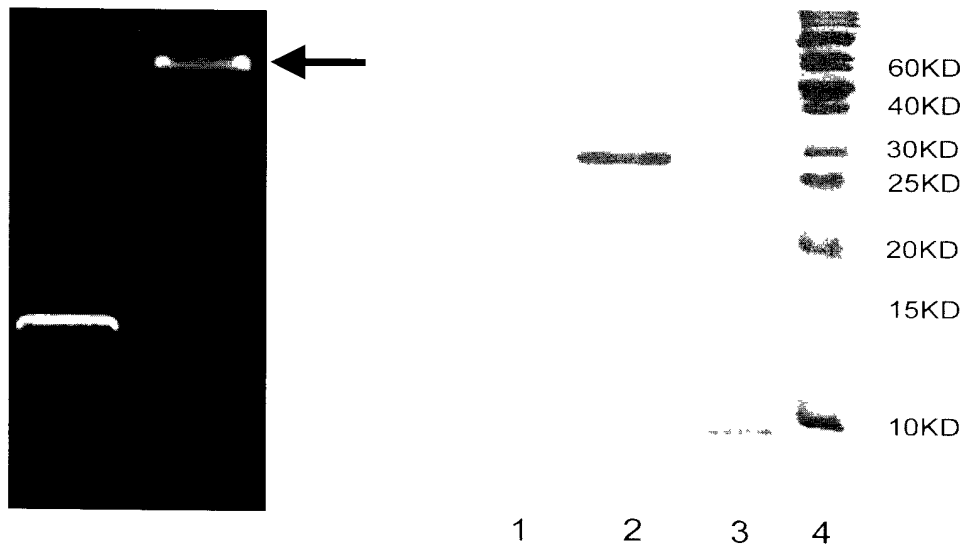


图 2

图 4

51B052-1.SEQ	160	170	180	190	200	
E.TXT	151 GACTTCATGT TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT	200				200
51B052-1.SEQ	210	220	230	240	250	
E.TXT	201 GTGCCTGGAT GCGTCCCAA AATTAGTTTG TTTTAAAAAA CGTATTGAAG	250				250
51B052-1.SEQ	260	270	280	290	300	
E.TXT	251 CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT CCAGCAAGTA TATAGCATGG	300				300
51B052-1.SEQ	310	320	330	340	350	
E.TXT	301 CCTTTGCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC ATCCTCCAAA	350				350
51B052-1.SEQ	360	370	380	390	400	
E.TXT	351 ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCATGTA <b>ATCATTGGTT</b> <b>TCGGAAAGAA</b>	400				400
51B052-1.SEQ	410	420	430	440	450	
E.TXT	401 <b>CAGGTACGTT</b> <b>AATAGTTAAT</b> <b>AGCGTACTTG</b> <b>TTTTTCTTGG</b> <b>TTTCTGGTA</b>	450				450
51B052-1.SEQ	460	470	480	490	500	
E.TXT	451 <b>TTTCTGTAG</b> <b>TCACACTAGC</b> <b>CATCCTTACT</b> <b>CCGCTTCGAT</b> <b>TGTGTCCGTA</b>	500				500
51B052-1.SEQ	510	520	530	540	550	
E.TXT	501 <b>CTGCTGCAAT</b> <b>ATTGTTAACC</b> <b>TCAGTTTAGT</b> <b>AAAACCAAGC</b> <b>GTTTACGCTT</b>	550				550
51B052-1.SEQ	560	570	580	590	600	
E.TXT	551 <b>ACTCGCGTGT</b> <b>TAAAAATCTG</b> <b>AACTCTTCTG</b> <b>AAGGACTTCC</b> <b>TCATCTTCTG</b>	600				600
51B052-1.SEQ	610	620	630	640	650	
E.TXT	601 <b>CTCCTAAGAA</b> <b>TTCATCGTGA</b> <b>CTGACTGACC</b> <b>ATCTGCCTCG</b> <b>CGCGTTTCGG</b>	650				650
51B052-1.SEQ	660	670	680	690	700	
E.TXT	651 TGATGACG...	700				700

图 3