

## 毕赤酵母表达的含前 S1、前 S2 和 S 表位乙肝表面抗原疫苗的制备和免疫原性研究

# Preparation and Immunogenicity of a *Pichia pastoris*-derived Hepatitis B Vaccine Containing PreS1 , PreS2 and S Epitopes

谭昌耀\* 袁 进 金 瓯 蒋丽明 胡 波

TAN Chang-Yao\* , YUAN Jin , JIN Ou , JIANG Li-Ming and HU Bo

成都生物制品研究所生物技术研究室 ,成都 610023

Laboratory of Biotechnology , Chengdu Institute of Biological Products , Chengdu 610023 , China

**摘 要** 整合了乙肝表面抗原嵌合基因 SS1 和 SS2 的毕赤酵母工程菌株 GS115-SS1S2 经高密度发酵培养 ,甲醇诱导 ,抗原表达量达到 300 ~ 600mg/L 发酵液。SS1S2 抗原经细胞破碎、硅胶吸附、疏水层析和凝胶过滤纯化 ,纯度达 99% 以上 ,每升培养物可收获纯化抗原 82mg。纯化的 SS1S2 抗原经  $Al(OH)_3$  吸附 ,在 NIH 小鼠中进行免疫效果评价。三组 NIH 雌性小鼠 ,分别腹腔接种 2.5 $\mu$ g、0.625 $\mu$ g 和 0.156 $\mu$ g SS1S2 疫苗或商品化的单 S 疫苗。部分小鼠在 30 天时采血 ,测定各疫苗组的  $ED_{50}$  值。在 SS1S2 疫苗组 ,前 S1、前 S2 和 S 抗原的  $ED_{50}$  值分别为 0.46、0.29 和 0.84 $\mu$ g ,而 S 疫苗组 S 抗原的  $ED_{50}$  为 0.99 $\mu$ g。另一部分小鼠分别在 7 天和 14 天时采血 ,考察抗体阳转率与时间的关系。SS1S2 疫苗前 S1、前 S2 抗体阳转率在 7d 和 14d 时比 S 抗体的阳转率为高 ,提示前 S 抗体出现的时间较早。上述结果显示 SS1S2 疫苗比单 S 疫苗具有更好的免疫原性。

**关键词** 前 S1 ,前 S2 ,制备 ,免疫原性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0700-04

**Abstract** The preparation process and immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing preS1 , preS2 and S epitopes were investigated in this study. A *Pichia pastoris* strain GS115-SS1S2 harbouring two chimeric HBsAg gene constructs , SS1 and SS2 was cultivated by high-density fermentation. 300 ~ 600mg/L of the expression level was achieved through 48 ~ 72h methanol induction. SS1S2 antigen was extracted and purified by silica adsorption , HIC and SEC to 99% purity from the harvested cells. 82mg purified antigen could be achieved from one liter of fermentation culture. The immunogenicity of the purified antigen was evaluated in NIH mice. Three groups of female NIH mice , 14 ~ 16g in weight , were injected once intraperitoneally with 2.5 , 0.625 , 0.156 $\mu$ g of each of the two vaccines : SS1S2 or a commercially available S vaccine. Part of the mice were bled in 30 days after injection to compare the  $ED_{50}$  of the two vaccines. For the SS1S2 vaccine , the  $ED_{50}$  is 0.46 , 0.29 and 0.84 $\mu$ g respectively for the preS1 , preS2 and S antigens. For the S vaccine , the  $ED_{50}$  is 0.99 $\mu$ g for the S antigen. Another part of the mice were bled in 7 or 14 days to detect preS1 , preS2 and S antibodies. Higher ratios of mice were seroconverted for preS1 and preS2 antibodies as compared to the S antibody in these two time points. These results suggest that the SS1S2 vaccine may be more

Received : December 27 , 2006 ; Accepted : February 22 , 2007.

This work was supported by a grant from Science and Technology Office of Sichuan Province ( No.04SG0248 ).

\* Corresponding author. Tel : + 86-28-84418872 ; E-mail : changyao\_tan@hotmail.com

四川省科技攻关计划项目( No.04SG0248 )

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

immunogenic than the conventional S vaccines.

**Key words** preS1, preS2, preparation, immunogenicity

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染性疾病,在世界范围内流行。据世界卫生组织报道,全球约 20 亿人曾感染 HBV,其中慢性感染者 3.5 亿人,每年约 100 万人死于 HBV 引起的肝衰竭、肝硬化和肝癌。中国作为乙肝的高流行区,约 10% 的人群为乙肝病毒表面抗原(HBsAg)携带者。目前对乙型肝炎还缺乏有效的治疗手段,进行乙肝疫苗免疫接种是预防和控制乙型肝炎唯一有效的方法。

最早的乙型肝炎疫苗是由从乙肝病毒携带者血浆中分离的乙肝表面抗原颗粒制成的,由于血浆来源有限,加之成本 and 安全性方面的考虑,这类疫苗在大多数国家和地区已停止使用。目前世界上广泛使用的是重组酵母或 CHO 细胞产生的由乙肝病毒表面抗原主蛋白(S)构成的基因工程疫苗。与血源疫苗相比,基因工程疫苗成本较低,安全性更好,已取得了很好的免疫效果。但这种单 S 的重组疫苗也有诸多不足,如免疫程序过长,乙肝病毒突变株导致的免疫逃逸及部分人群无应答或低应答等。因此,开发免疫原性更好、价格更为低廉的新型疫苗仍有其紧迫性。

乙肝病毒包膜蛋白含有前 S1(preS1)、前 S2(preS2)和主蛋白(S)三种抗原成分。研究表明,preS1 含肝细胞结合位点(aa21~47),能介导乙肝病毒与肝细胞的结合,preS1 抗血清能够中和乙肝病毒的毒力,保护大猩猩免受乙肝病毒感染<sup>[1,2]</sup>。同时,preS2 抗原具有比 S 蛋白更强的免疫原性,用含 preS2 和 S 区的乙肝表面抗原免疫小鼠,可以让对 S 抗原无应答的小鼠产生抗体应答<sup>[3]</sup>。因此,在疫苗中加入前 S 成分可能会增强疫苗的免疫效果。我们在以往的工作中曾构建成功同时表达 SS1、SS2 两种融合多肽,preS1、preS2 和 S 三种抗原成分的毕赤酵母工程菌株,本文对该融合抗原疫苗的制备和免疫原性进一步进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 毕赤酵母菌株 GS115-SS1S2 由本实验室构建。该菌株染色体中整合了 SS1 和 SS2 两个融合基因片段,能够同时表达 SS1、SS2 两种多肽并组装成颗粒样结构<sup>[4]</sup>。

**1.1.2 培养基** 基础盐溶液 85% 磷酸 26.7mL,硫酸钙 0.93g,硫酸钾 18.2g,7 水合硫酸镁 14.9g,氢氧化

钾 4.13g,甘油 40.0g,补加蒸馏水至 1L;PTM1 微量盐溶液 5 水合硫酸铜 6.0g,碘化钠 0.08g,1 水合硫酸锰 3.0g,2 水合钼酸钠 0.2g,硼酸 0.02g,氯化钴 0.5g,氯化锌 20.0g,7 水合硫酸亚铁 65.0g,生物素 0.2g,硫酸 5.0mL,补加蒸馏水至 1L。

**1.1.3 纯化介质** Aerosil 380 硅胶购自德国 DEGUSSA 公司,Butyl-S Sepharose 6FF 疏水凝胶和 Sepharose 4FF 分子筛凝胶购自 GE 公司,其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.4 试验动物** NIH 雌性小鼠,14~16g,由本所实验动物室提供。

**1.1.5 检测试剂** 乙肝表面抗原反相血凝(RPHA)试剂盒和乙肝表面抗体(S)酶标试剂盒购自上海科华生物技术有限公司,前 S1 抗体酶标试剂盒购自上海阿尔法生物技术有限公司,前 S2 抗体酶标试剂盒购自北京肝炎试剂研制中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 工程菌发酵** 挑取 GS115-SS1S2 单菌落,接种到 200mL MGY 培养基,30℃ 振荡培养过夜,转移到发酵罐继续培养。发酵罐为 NBS 公司 BioFlo3000 型 5 升发酵系统,内含 2L 含 PTM1 微量盐的基础盐溶液。设置适宜的 pH、溶氧、转速等,于 30℃ 进行发酵培养。待基础盐中的甘油消耗完以后,补加 50% 甘油 200mL,继续培养至甘油消耗完全,用含 PTM1 微量盐的甲醇诱导 72h。培养期间定时抽样,进行菌体密度和抗原滴度测定。发酵完成后离心收集菌体,储存于 -20℃ 备用。

**1.2.2 抗原抽提和粗提纯** 取冻存菌体加入 0.01mol/L 磷酸缓冲液,用玻璃珠研磨破碎,加入 0.1% Tween-20,置 4℃ 搅拌 1h,调 pH 至 6.0,离心去沉淀,于上清中加入适量 5% 硅胶于 4℃ 吸附过夜,离心收集硅胶,用 PBS 洗 3 次,用 pH10.0 含 1mol/L NaCl 的 25mmol/L 碳酸缓冲液洗脱,收集上清备用。

**1.2.3 抗原纯化** 将硅胶吸附后的抗原经过疏水层析(HIC)和凝胶过滤(SEC)进一步进行精细纯化,用 Lowry 法测定纯化中间品的蛋白浓度以确定各步蛋白收量并计算回收率。将纯化样品进行 SDS-PAGE 和 HPLC 检测。

**1.2.4 疫苗制备** 在纯化抗原中以 1:4000 的比例加入甲醛溶液,置 37℃ 保温 72h,按乙肝表面抗原终浓度 10μg/mL 加入 1mg/mL Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂,振摇吸附 2~3min,置 4℃ 保存。

**1.2.5 免疫原性测定** :用 1mg/mL  $Al(OH)_3$  佐剂将待测疫苗及商品化的单 S 乙肝疫苗(天坛生物)稀释成 2.5 $\mu$ g/mL、0.625 $\mu$ g/mL 和 0.156 $\mu$ g/mL 三个剂量,分别腹腔接种 NIH 小鼠,每只接种 1mL,2.5 $\mu$ g/mL 剂量组每组 30 只,其他每组 10 只。2.5 $\mu$ g/mL 剂量组分别于接种后 7d、14d 和 30d 各取 10 只通过心脏采血,其余两个剂量均于 30d 时采血。分离血清,分别进行 S、前 S1 和前 S2 抗体测定。测定方法按试剂盒说明书进行。半数有效剂量( $ED_{50}$ )采用 Reed-Muench 法计算。

2 结果

2.1 工程菌的高密度发酵

工程菌发酵包括甘油批量培养、甘油补料培养和甲醇诱导三个阶段,其中诱导 48~72h 即可达到较高表达量,此时培养物浓度达到每毫升近 180 个  $OD_{600}$  单位。抽样破碎细胞,制备抗原提取液,用反相血凝法测定抗原滴度,同时以 CHO 细胞表达的纯化 HBsAg 作参照对表达量进行估算。经测定,10 $\mu$ g/mL 纯化 CHO 细胞 HBsAg 血凝效价为 1:256,发酵样品粗提液效价达到 1:8192~1:16384,即参考品的 32~64 倍,初步推算抗原表达量为 300~600mg/L 左右。图 1 为工程菌生长曲线。

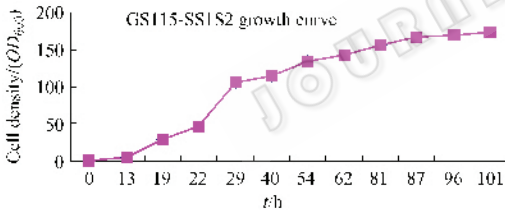


图 1 工程菌生长曲线  
Fig. 1 GS115-SS1S2 growth curve

2.2 抗原纯化

将纯化各步所得样品进行还原型 SDS-PAGE 电泳并经银染显色(图 2),结果显示,在经过硅胶吸附以后,大部分杂蛋白已被去除,疏水层析和凝胶过滤虽然可以进一步去除脂类和核酸,但电泳纯度本身已基本无变化。从图 2 可以看出,纯化的抗原带型完整,没有明显的降解条带。乙肝表面抗原内部含有多对二硫键,尽管采用还原型 SDS-PAGE 电泳,仍然有部分二聚体和多聚体存在,这一结果在我们以往的研究中被证实<sup>[4]</sup>,也与 Tleugabulova D 的研究相吻合<sup>[5]</sup>。

用 ELISA 方法检测纯化中间品及原液的抗原性,显示前 S1、前 S2 和 S 抗原均呈阳性。用 Lowry 法测定蛋白收量,每升发酵液最终可得纯化抗原

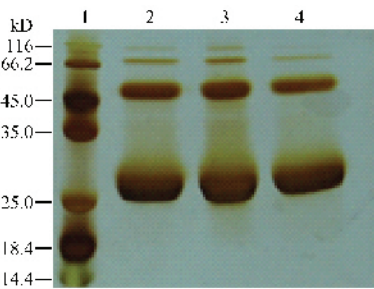


图 2 纯化抗原的 SDS-PAGE 电泳分析  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified antigens  
1: protein molecular marker(14.4, 18.4, 25.0, 35.0, 45.0, 66.2 and 116.0kD from bottom to top); 2: silica elution fraction; 3: HIC pooled fraction; 4: SEC pooled fraction.

82mg,表明纯化工艺具有很好的回收率。各中间步骤蛋白收量及回收率如表 1。

表 1 抗原纯化各步蛋白收率(纯化自 1 升发酵产物)  
Table 1 Protein yields and recovery rates from different purification steps( yields from 1L of culture )

Purification step	Silica adsorption	HIC	SEC
Total protein/mg	262	130	82
Recovery rates/ %	43.6	21.7	13.7

2.3 纯化抗原的 HPLC 纯度分析

用 TSK-GEL G5000 PWXL 高效色谱柱测定纯化抗原纯度。样品上样量 50 $\mu$ L,以 10mmol/L PB, pH7.2 缓冲液为流动相进行分析。层析图谱经电脑积分,抗原主峰含量在 99% 以上(图 3)。

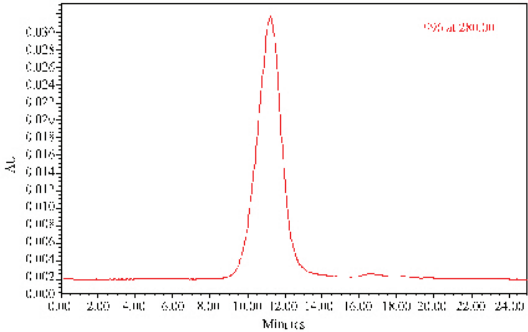


图 3 纯化抗原的 HPLC 纯度分析  
Fig. 3 Chromatogram of HPLC of purified antigen  
Sample: 136 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ L; Column: TSK-GEL G5000 PWXL; Eluent: 10mmol/L PB buffer pH 7.2.

2.4 不同剂量 SS1S2 疫苗在小鼠中的抗体阳转率及  $ED_{50}$  测定

在 SS1S2 疫苗和商品化的单 S 疫苗免疫小鼠 30d 时采血,进行 S、前 S1 和前 S2 抗体测定。由于有些小鼠采血不成功,致使部分组别只有 9 或 8 只小鼠。抗体测定结果表明,单 S 疫苗只产生 S 抗体,受试 SS1S2 疫苗不但能诱导 S 抗体,还能诱导前 S1 和前 S2 抗体产生。通过 Reed-Muench 法计算各抗

原组的 ED<sub>50</sub> 值,SS1S2 疫苗各单一组分的 ED<sub>50</sub> 值均低于对照苗,显示在小鼠中具有更好的免疫原性。结果见表 2。

表 2 SS1S2 疫苗与单 S 商品苗免疫原性的比较  
Table 2 Comparison of immunogenicity between SS1S2 and commercial S vaccine in NIH mice

Antigen Antibody	SS1S2			S
	anti-S	anti-preS1	anti-preS2	anti-S
2.5μg	8/9	9/9	7/9	7/9
0.625μg	3/10	4/10	7/10	3/9
0.156μg	2/10	4/10	5/10	1/8
ED <sub>50</sub> /μg	0.84	0.46	0.29	0.99

2.5 SS1S2 免疫小鼠后抗体阳转率与时间的关系

从表 3 可以看出,SS1S2 疫苗免后 7d 已有个别小鼠产生了前 S1 和前 S2 抗体,而 S 抗体均为阴性,14d 时前 S 抗体阳转率也明显高于 S 抗体,提示前 S 抗体的产生可能早于 S 抗体。

表 3 抗体阳转率与时间的关系

Table 3 Seroconversion rates at different time intervals

Antigen Antibody	SS1S2			S
	anti-S	anti-preS1	anti-preS2	anti-S
7days	0/10	1/10	1/10	0/9
14days	2/10	7/10	5/10	3/9
30days	8/9	9/9	7/9	7/9

3 讨论

乙肝表面抗原前 S 区特别是前 S2 区对蛋白酶很敏感,极易发生降解<sup>[6]</sup>,难以进行规模化制备。我们构建的毕赤酵母 GS115-SS1S2 工程菌株,由于采用了新的基因结构和表达方式,在保持前 S 组分抗原性的同时,其稳定性也得到根本改善。从发酵到纯化的整个过程,没有采用特别的技术手段如添加蛋白酶抑制剂等,仍然得到了纯度很高、结构完整的前 S 抗原。在小鼠效力试验中前 S1 和前 S2 抗原均显示出了良好的免疫原性,进一步验证了其免疫效力和结构完整性。

目前国外已有含前 S1、前 S2 组分的乙肝疫苗问世,如欧洲的 Hepacare<sup>[7,8]</sup> 和以色列的 Bio-Hep B<sup>[9,10]</sup>,免疫效果均显著优于含单 S 成分的乙肝疫苗。但这两种疫苗主要成分仍然是单 S 抗原,前 S 组分含量还比较低,而且都是在哺乳动物细胞中生产的,成本较高,生产规模也有一定的限制。我们构建的含前 S 区乙肝表面抗原由 SS1 和 SS2 两种融合多肽组成,每一条肽链都含有前 S 成分,前 S 抗原的比例要显著高于 Hepacare 和 Bio-Hep B 的水平。抗原表达所采用的毕赤酵母系统,表达量高,成本低

廉,易于规模化培养。本研究建立的纯化工艺流程采用硅胶吸附和层析的方法,没有采用常规乙肝疫苗生产中通常使用的超速离心法,有效降低了成本,也有利于工艺的放大。目前从每升发酵液中已可收获超过 80mg 纯度 99% 以上的制品,这一指标已远远高于现有单 S 疫苗在酿酒酵母或 CHO 细胞中的生产水平。另外,从免疫效果上看,SS1S2 疫苗能够在小鼠中诱导产生前 S1、前 S2 和 S 三种抗体,而且与商品化单 S 疫苗相比,每一个单一组分都能以较低的剂量产生更高的阳转率。由于前 S1、前 S2 同为保护性抗原,这种多表位疫苗将能更为有效地对抗病毒变异株。在抗体产生的时间方面,初步的动物试验显示,前 S1 和前 S2 抗体产生的时间也要早于 S 抗体。上述结果表明,毕赤酵母表达的含前 S1、前 S2 和 S 表位重组乙肝疫苗不论是在生产效率还是在免疫效果方面都比现有单 S 疫苗有了明显提高,具有很好的开发前景。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Neurath AR, Seto B, Strike N. Antibodies to synthetic peptides from the PreS1 region of the hepatitis B virus( HBV ) envelope( env ) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine*, 1989, **7**( 3 ): 234 – 236.

[ 2 ] Pride MW, Bailey CR, Muchmore E, *et al.* Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with Hepagene<sup>®</sup>, a hepatitis B vaccine containing pre-S1, pre-S2 and S gene products. *Vaccine*, 1998, **16**: 543 – 550.

[ 3 ] Milich DR, Thornton GB, Neurath AR, *et al.* Enhanced immunogenicity of the preS region of hepatitis B surface antigen. *Science*, 1985, **228**: 1195 – 1199.

[ 4 ] Tan CY( 谭昌耀 ) Jiang LM( 蒋丽明 ), Ge YH( 葛永红 ), *et al.* Simultaneous expression of modified hepatitis B surface antigen fusion polypeptide containing preS1, preS2 epitopes in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ), 2006, **22**( 4 ): 604 – 608.

[ 5 ] Tleugabulova D. Size-exclusion chromatographic study of the reduction of recombinant hepatitis B surface antigen. *J of Chromatography B*, 1998, **713**: 401 – 407.

[ 6 ] Langley KE, Egan KM, Barendt JM, *et al.* Characterization of purified hepatitis B surface antigen containing pre-S( 2 ) epitopes expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1988, **67**: 229 – 245.

[ 7 ] Page M, Jones CD, Bailey C. A novel recombinant triple antigen hepatitis B vaccine( Hepacare ). *Intervirolgy*, 2001, **44**: 88 – 97.

[ 8 ] Zuckerman JN, Zuckerman AJ, Symington I, *et al.* Evaluation of a new hepatitis B triple-antigen vaccine to inadequate responders to current vaccines. *Hepatology*, 2001, **34**( 4 ): 798 – 802.

[ 9 ] Madalinsky K, Sylvan SPE, Hellstrom U, *et al.* Antibody response to preS components after immunization of children with low doses of BioHep B. *Vaccine*, 2002, **20**: 92 – 97.

[ 10 ] Madalinsky K, Sylvan SPE, Hellstrom U, *et al.* Presence of anti-preS1, anti-preS2, and anti-HBs antibodies in newborns immunized