

· 生物技术与方法 ·

具备定点偶联功能的 HBc-VLPs 的制备与性质鉴定

刘地¹, 李博¹, 毕成², 乔宏萍¹, 武晓英¹

1 太原师范学院 生物系 天然生物活性成分创制兽药工程中心, 山西 晋中 030619

2 悉尼大学 科学院, 澳大利亚 新南威尔士州 2006

刘地, 李博, 毕成, 等. 具备定点偶联功能的 HBc-VLPs 的制备与性质鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1440-1449.

Liu D, Li B, Bi C, et al. Preparation and characterization of HBc virus like particles with site-directed coupling function. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1440-1449.

摘要: 乙型肝炎病毒核心蛋白 HBc, 可在体外自组装形成二十面体对称结构的病毒样微粒 VLPs。VLPs 可将外源序列重复且高密度地展示在表面, VLPs 进入机体后能够快速诱导机体产生针对外源性抗原的特异性体液免疫及细胞免疫应答, 具有极强的免疫原性与生物活性。因此, HBc-VLPs 可以作为一种安全、有效的疫苗载体。文中设计了一种能够实现与抗原定点偶联的 HBc-VLPs, 并开发了一套高效制备 HBc-VLPs 的方法。通过定点突变技术, 使翻译后的多肽序列第 80 位氨基酸由 Ala 变为 Cys, 在 HBc-VLPs 的主要免疫显性区域引入一个定点交联位点, 构建了原核表达载体 pET28a(+)-hbc, 表达、纯化获得了高纯度的 HBc(A80C) 单体蛋白; 在 PB 缓冲体系中, HBc(A80C) 蛋白自组装形成 HBc-VLPs 纳米粒子。粒度仪的测定结果表明, HBc-VLPs 纳米微粒的平均粒径为 29.8 nm, 透射电子显微镜观察到 HBc-VLPs 形成粒径约为 30 nm 的球形微粒, 其形态与天然的 HBV 微粒相似。以流感病毒 M2e 抗原肽为模式抗原, 通过 Sulfo-SMCC 氨基-巯基双功能交联剂, 将 M2e 定点连接于 HBc-VLPs 通过突变引入的 Cys 残基处, 制备了 M2e-HBc-VLPs 模式疫苗, 通过细胞荧光示踪, 验证了 HBc-VLPs 结构的完整性与 M2e 的正确交联。动物免疫实验表明该疫苗能够有效刺激小鼠产生抗原特异性的 IgG 抗体, 验证了疫苗载体 HBc-VLPs 的有效性。研究结果为 HBc-VLPs 作为疫苗载体的研究奠定了基础, 能够促进 HBc-VLPs 载体疫苗的研发以及 HBc-VLPs 在其他领域的应用。

关键词: 病毒样颗粒, 乙型肝炎病毒核心蛋白, 定点偶联, 疫苗载体

Received: November 28, 2019; **Accepted:** February 17, 2020

Supported by: Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi Province (No. 2019L0821), Key Program of the Shanxi Province Research and Development Program (No. 201603D21109-1-2).

Corresponding authors: Di Liu. E-mail: diliu@tynu.edu.cn

Xiaoying Wu. E-mail: wuxy@tynu.edu.cn

山西省高等学校科技创新项目 (No. 2019L0821), 山西省重点研发计划重点项目 (No. 201603D21109-1-2) 资助。

网络出版时间: 2020-03-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200310.1115.001.html>

Preparation and characterization of HBc virus like particles with site-directed coupling function

Di Liu¹, Bo Li¹, Cheng Bi², Hongping Qiao¹, and Xiaoying Wu¹

¹ Department of Biology and Center for Veterinary Medicine, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, Shanxi, China

² Faculty of Science, The University of Sydney, New South Wales 2006, Australia

Abstract: Hepatitis B virus core protein can self-assemble into icosahedral symmetrical viral-like particles (VLPs) *in vitro*, and display exogenous sequences repeatedly and densely on the surface. VLPs also have strong immunogenicity and biological activity. When the nanoparticles enter the body, they quickly induce specific humoral and cellular immune responses to exogenous antigens. In this study, we designed an HBc-VLPs that can be coupled with antigens at specific sites, and developed a set of efficient methods to prepare HBc-VLPs. Through site-specific mutation technology, the 80th amino acid of peptide was changed from Ala to Cys, a specific cross-linking site was inserted into the main immunodominant region of HBc-VLPs, and the prokaryotic expression vector pET28a(+)-hbc was constructed. After expression and purification, high purity HBc(A80C) monomer protein was assembled into HBc-VLPs nanoparticles in Phosphate Buffer. The results of particle size analysis show that the average particle size of nanoparticles was 29.8 nm. Transmission electron microscopy (TEM) showed that HBc-VLPs formed spherical particles with a particle size of about 30 nm, and its morphology was similar to that of natural HBV particles. The influenza virus antigen M2e peptide as model antigen was connected to Cys residue of HBc-VLPs by Sulfo-SMCC, an amino sulfhydryl bifunctional cross-linking agent, and M2e-HBc-VLPs model vaccine was prepared. The integrity of HBc-VLPs structure and the correct cross-linking of M2e were verified by cell fluorescence tracing. Animal immune experiments showed that the vaccine can effectively stimulate the production of antigen-specific IgG antibody in mice, which verified the effectiveness of the vaccine carrier HBc-VLPs. This study lays a foundation for the research of HBc-VLPs as vaccine vector, and help to promote the development of HBc-VLPs vaccine and the application of HBc-VLPs in other fields.

Keywords: virus-like particles, hepatitis B virus core protein, site directed coupling, vaccine vector

病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是一种高度结构化的多聚体纳米微粒, 与天然的病毒形态相似, 由病毒的结构蛋白自组装形成, 但是不含病毒的遗传物质^[1-2]。因此, VLPs 是非复制性和非传染性的。VLPs 具有很强的免疫原性以及生物学活性, 易于被免疫系统识别, 诱导机体固有和适应性免疫应答^[3-4]。多数 VLPs 的直径在 20–100 nm 之间, 可自由进入淋巴管, 被动引流至淋巴结的包膜下区域, 并由专职抗原呈递细胞摄取^[5]。VLPs 同多数抗原一样是通过主要组织相容性复合体 MHC I 和 MHC II 分子加工和呈递抗原, 通过 VLPs 与补体成分或 IgM 抗体之间的特定相互作用, 促进 VLPs 向 B 细胞滤泡的转运。VLPs 表面的刚性结构以及多价、高度重复的抗原表位可广泛交联 B 细胞受体, 引发对 B 细胞的强

烈刺激, 诱导强烈而持久的抗体反应^[6]。

VLPs 的这些特性使其可作为非常有效的疫苗载体, 研究发现 VLPs 的结构允许外源基因或基因片段插入形成嵌合型 VLPs, 然后将外源性抗原展示在表面^[7]。除此之外, 多数 VLPs 颗粒还具有包裹核酸 (DNA、RNA) 以及其他小分子的能力^[8]。VLPs 能够诱导机体产生高而持久的抗体反应, 增强抗原稳定性, 保护抗原免于降解, 其较高的安全性, 适用于特殊人群, 如婴儿、老年人以及免疫功能低下的患者^[9]。目前, 已经上市的 VLPs 疫苗有乙型肝炎病毒 VLPs 疫苗 (Recombivax HB, Merck; Engerix-B, GSK; Elovac B, HBI)^[11]、人乳头状瘤病毒 VLPs 疫苗 (Gardasil[®], Merck; Cervarix[™], GSK)^[10]、流感病毒 VLPs 疫苗 (Inflexal V, Berna)^[11]、甲型肝炎

病毒 VLPs 疫苗 (Epaxal, Berna)^[12]。一些其他疾病的 VLPs 疫苗也已经处于临床实验阶段^[13-15]。此外,作为抗肿瘤药物的主动靶向载体,VLPs 也展现出了极大的优势与应用前景^[16]。

乙型肝炎病毒核心蛋白 (Hepatitis B virus core protein, HBc) 能够形成二十面体对称结构的病毒样微粒,构象上近似于天然的乙肝病毒微粒^[17]。HBc 所形成的衣壳在大肠杆菌、酵母、昆虫及植物表达系统中均能得到正确的表达^[18]。大肠杆菌所表达 HBc 蛋白主要可以形成 2 种类型的颗粒,分别是由 180 个单体形成直径 30 nm 的 T=3 型颗粒和由 240 个单体形成直径 34 nm 的 T=4 型颗粒^[19]。其 N 末端、C 末端和免疫显性表位区域允许一定程度外源序列的插入,N 末端插入外源序列能够将外源序列重复且高密度地暴露在颗粒的表面,快速诱导机体产生针对外源性抗原的特异性体液免疫及细胞免疫应答^[20],因此,HBc-VLPs 是一种安全、有效的疫苗载体。这种纳米级的载药平台,为新型的疫苗研发提供了新的思路,在生物医学研究、疫苗开发、药物载体开发和基因治疗中拥有广阔的应用前景。

本研究通过基因工程技术,定向改造 HBc 基因,在 HBc-VLPs 的主要免疫显性区域引入一个定点交联位点,利用大肠杆菌表达系统,制备 HBc(A80C) 单体蛋白,体外在适宜的缓冲体系中自组装形成 HBc-VLPs,并对其表征与活性测定,通过模式抗原的定点交联以及动物免疫实验,验证了该疫苗载体的有效性。本研究提供了一种将抗原与 HBc-VLPs 定点连接的新思路,并开发了一套高效的 HBc-VLPs 制备方法,可大量、低成本地制备具有定点偶联功能的 HBc-VLPs,为 HBc-VLPs 作为疫苗载体的研究与应用提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表达载体 pET28a(+) 购于 Novagen 公司。工

程菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 购于 Invitrogen 公司。人肺腺癌细胞 A549 和人结直肠腺癌细胞 HCT-116 购于中国科学院细胞库。流感病毒基质蛋白胞外功能区 (Ectodomain of matrix protein 2, M2e) 模式抗原肽 (N 端-SLLTEVETPIRNEWGKRSNDSSD-C 端),由合肥国肽生物科技有限公司合成,其中赖氨酸 (K) 用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记侧链。实验动物 BALB/c 小白鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司。卡那霉素 (Kan)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸 3-磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯钠盐 (Sulfo-SMCC) 购于 Sigma-Aldrich 公司。RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清、胰酶、青链霉素混合液购于 Thermo Fisher Scientific 公司, Anti-HBcAg 抗体购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司,其他分析纯化学试剂购于上海凌峰化学试剂有限公司。

1.2 重组质粒的构建

重组质粒 pET28a-hbc 由实验室构建,构建示意图如图 1A 所示。基因 hbc 原始序列参照 NCBI GenBank (登录号 HE981189.1),由苏州金唯智生物科技有限公司进行序列的合成。根据 hbc 基因序列设计一对特异性引物与一对突变引物 (表 1),利用重叠延伸 PCR 技术,将分别以 F-Rm、Fm-R 为两组引物,扩增两个突变片段,再以 F-R 扩增完整的序列。通过连续的 3 次 PCR,将序列中 238-240 位的 GCA 突变为 TGT (图 1B)。反应体系 (50 μ L): *Pfu* DNA 聚合酶 0.25 μ L、10 \times 缓冲液 5 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L、上、下游引物各 1 μ L、质粒模板 1 μ L、ddH₂O 37.75 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收目的片段。

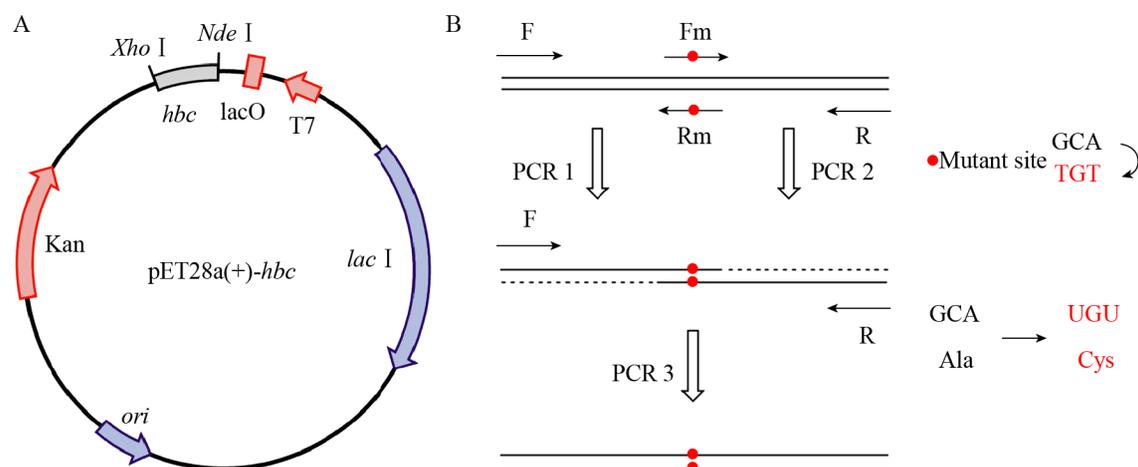


图 1 pET28a(+)-hbc 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of pET28a(+)-hbc recombinant plasmid. (A) Schematic diagram of recombinant plasmid pET28a(+)-hbc construction. (B) Schematic diagram of site-directed mutagenesis by overlap extension PCR.

表 1 引物序列与特征

Table 1 Characters and sequences of primers

Primers name	Sequence (5'-3')	Restriction endonucleases
HBc-F	GGAATTC <u>CA</u> TATGGACATCGACCCGTACAAGGAGTTCG	<i>Nde</i> I
HBc-Fm	GGAAGATCCA <u>TGT</u> TCCAGAGATTTG	-
HBc-Rm	CCTTCTAGGT <u>ACA</u> AGGTCTCTAAAC	-
HBc-R	CCGCTCGAGTTACACCACAGTGGTTCCGG	<i>Xho</i> I

Note: the underlined sequences are restriction enzyme cutting sites and the yellow-shaded sequences are mutated sites.

目的 DNA 片段与载体 pET-28a(+) 质粒分别限制内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切回收后, 使用连接试剂盒进行酶切产物的连接, 16 °C 连接 8 h。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 从平板上挑取经 Kan 抗性筛选的单克隆菌落培养, 通过菌液 PCR 初步确定阳性克隆后, 由华大基因 (中国, 上海) 完成商业化的测序工作。测序结束后, 通过序列比对分析测序结果, 挑选出构建正确的重组菌株提取质粒。

1.3 HBc(A80C) 蛋白的表达与纯化

将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 从抗性平板上挑取单克隆, 接种到含 LB 培养基的试管中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。取 1 mL 菌液加入到含 100 mL LB 培养基的锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养约 2.5 h。菌液 OD₆₀₀

达到约 0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 30 °C 诱导表达 10 h。诱导结束后 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 采用 Phosphate Buffer(PB) 缓冲体系 (pH 7.4) 进行纯化, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳与 Western blotting 分析蛋白的表达与纯化的结果。

1.4 HBc-VLPs 的组装与凝胶纯化

将纯化后的 HBc(A80C) 蛋白溶液加到处理过的透析袋内, 将透析袋放入组装缓冲液中 (PB 缓冲液, pH 7.4, 不含尿素), 4 °C 处理 12 h, 缓慢除去蛋白溶液中的尿素, 蛋白自组装, 期间更换 2-3 次缓冲液。蛋白组装结束后, 4 °C、10 000 \times g 离心 20 min, 收集上清液。在上清液中加入硫酸铵溶液, 室温放置 30 min, 10 000 \times g 离心 15 min, 收集沉淀, 加入磷酸盐缓冲液使微粒

复溶。复溶后的样品通过 Sepharose 层析柱进一步纯化, 最后将洗脱后的样品超滤浓缩。

1.5 Hbc-VLPs 微粒的染色与电镜表征

采用负染色法, 将 50 μL 样品滴于有支持膜的铜网正中间, 待蛋白溶液自然风干后, 滴加 5% 磷钨酸染液于铜网上, 静置 5 min 后, 将铜网上多余的磷钨酸染液用滤纸吸干, 样品处于半干状态时使用 JEM-1400 透射电镜观察、拍照。

1.6 Hbc-VLPs 微粒的粒径分布

用超纯水将 Hbc-VLPs 稀释到几个不同的浓度 (小于 1 mg/mL), 超声处理, 将合适浓度的 Hbc-VLPs 溶液 800 μL 置于洁净的测量皿中进行粒径测定, 利用马尔文激光粒度仪 Zetasizer Nano ZS 测量 Hbc-VLPs 的粒径分布情况。

1.7 抗原肽 M2e 与 Hbc-VLPs 的定点交联

将 4 mg Sulfo-SMCC 溶于 2 mL ddH₂O, 配制成 2 mg/mL 的 Sulfo-SMCC 溶液。将 Sulfo-SMCC 溶液缓慢滴加到 2 mg/mL 的 M2e 溶液中, 等比例混合, 室温反应 1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 PBS 溶液透析 6 h, 除去未交联的 Sulfo-SMCC。将交联后的 M2e 抗原肽与 1 mg/mL 的 Hbc-VLPs 溶液按照 10:1 的比例混合, 室温反应 4 h, 透析除去未交联的抗

原肽 (交联过程如图 2 所示)。

1.8 抗原肽 M2e 与 Hbc-VLPs 交联产物的荧光示踪

将处于对数期生长的 A549 和 HCT-116 细胞用胰酶消化, 待细胞能够从瓶壁上脱落时, 加入培养基终止消化。用一次性无菌吸管吹散细胞, 制备单细胞悬液, 用血球计数板统计细胞数量, 取出部分细胞悬液, 添加培养基将细胞稀释为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 。将稀释后的细胞悬液加入 6 孔板中, 每孔添加 1 mL, 再加入 1 mL 细胞培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养。待细胞贴壁后, 弃去培养液, 加入含有 M2e 与 Hbc-VLPs 交联产物 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养液 2 mL。作用细胞 3 h 后, 弃去培养液, 用 PBS 溶液洗涤 2 遍, 在荧光显微镜下观察细胞内荧光分布情况。

1.9 模式疫苗 M2e-Hbc-VLPs 的动物免疫

选取 6-8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠, 随机分配到笼内, 每组 6 只。将 M2e-Hbc-VLPs、未交联的 M2e 抗原肽分别对不同组内的小鼠进行皮下注射, 根据实验设计 50 μg 或 100 $\mu\text{g}/\text{只}$, 空白对照组注射相同体积的无抗原缓冲液作为阴性对照。初次免疫后, 间隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。动物实验依照 3R 原则, 并给予相应的人道关怀。

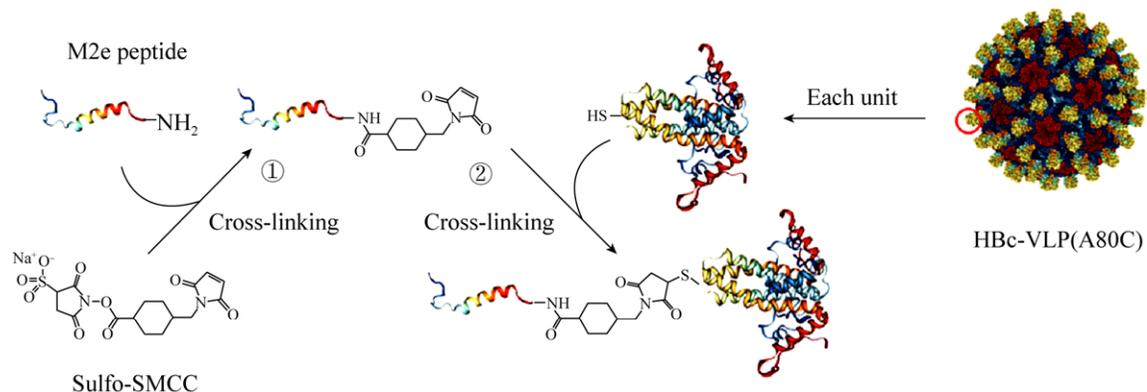


图 2 通过 Sulfo-SMCC 介导的两步法定点交联抗原肽 M2e 与 Hbc-VLPs 示意图

Fig. 2 Two-step reaction scheme for conjugating M2e peptide and Hbc-VLPs with Sulfo-SMCC. The Sulfo-SMCC crosslinker is first reacted with the M2e peptide to produce a maleimide-activated peptide. After excess non-reacted crosslinker and by-products are removed, the maleimide-activated M2e peptide is reacted with the sulfhydryl groups of Hbc-VLPs.

1.10 免疫动物血清中抗原特异抗体的检测

每孔加入 100 μL 稀释到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 M2e 抗原包被液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 次日, 弃去包被液, 洗涤。加入 300 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 弃去封闭液, 洗涤。将稀释后的血清样品加入反应孔中, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 弃去样品液, 洗涤。加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 弃去二抗溶液, 洗涤。加入 100 μL OPD 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。加入 100 μL 终止液, 随后在酶标仪上检测 492 nm 反应产物的吸光度。

2 结果与分析

2.1 pET-28a(+)-hbc 重组质粒

以公司合成的包含 *hbc* 基因完整序列的质粒为模板, 用相应的引物进行点突变并扩增 *hbc* 基因序列, 重叠延伸 PCR 反应结束后扩增出两条明亮、单一的条带, 电泳结果如图 3 所示, 在 500 bp 附近处出现单一、明亮的条带, 这与理论大小 469 bp (含酶切位点与保护碱基) 相符, 扩增序列正确。经过酶切、连接、转化等步骤后, 菌液 PCR 验证目标序列的载入, 测序显示载入序列与理论序列完全一致, 序列中 238–240 位已从 GCA 突变为 TGT, 说明重组质粒 pET-28a(+)-*hbc* 构建成功。

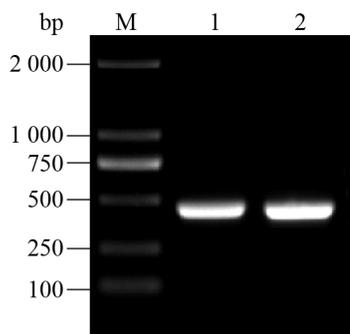


图 3 *hbc* 片段扩增的电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of *hbc*. Lane M: DL 2 000 marker; Lane 1, 2: *hbc* amplification fragment.

在重组载体设计之初, 我们就将表达 HBc 蛋白 C 末端 150–183 位氨基酸的基因序列除去, 仅保留了 1–149 位氨基酸的基因序列。研究表明 150–183 位氨基酸对颗粒的形成和衣壳的大小与形态的维持是非必需的, 除去 HBc 蛋白 C 末端含有病毒衣壳 RNA/DNA 结合位点的 150–183 残基序列, 能够防止 RNA/DNA 与病毒衣壳结合^[21], 且大多数 149 残基衣壳肽链经大肠杆菌表达都会组装形成 T=4 型微粒^[22]。这样的设计保证了颗粒的均一性, 并且 T=4 型微粒的结构与天然的 HBV 衣壳一致。在 HBc 肽链的 1–149 位氨基酸中含有 3 个半胱氨酸残基, 位置分别位于 48、61、107 位。48 位 Cys 与 61 位 Cys 通常参与链间二硫键的形成, 107 位 Cys 被埋藏于核心颗粒的内部^[23], 3 个位点都不是抗原肽结合的最佳位置。而 78–82 位氨基酸位于病毒微粒表面突起的顶部, 是 HBc 的主要免疫显性区域^[17], 是抗原肽交联的最佳区域, 因此, 选取此区域引入半胱氨酸残基。78 位到 82 位的氨基酸分别为 78 天冬氨酸 (Asp)、79 脯氨酸 (Pro)、80 丙氨酸 (Ala)、81 丝氨酸 (Ser)、82 精氨酸 (Arg), 通过分析 5 个氨基酸的理化性质, 以及氨基酸改变后对蛋白结构的影响, 将 80 位丙氨酸变为半胱氨酸带来的结构改变最小, 是最佳的选择 (图 4)。

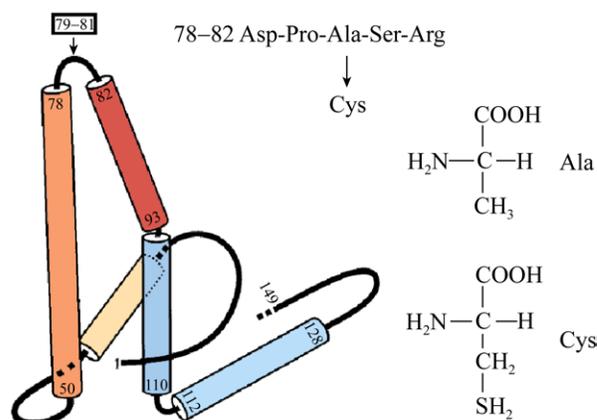


图 4 交联位点氨基酸的分析

Fig. 4 Analysis of amino acids at the crosslinking sites.

2.2 HBc(A80C) 蛋白表达、纯化与鉴定

重组菌在 30 °C 经过 IPTG 诱导 10 h 后, SDS-PAGE 结果显示, 在 14.1 kDa 与 20.1 kDa 之间出现了明显的蛋白条带, 对应的分子量与预测的结果 16.8 kDa (ExPasy, <http://www.expasy.org/>) 相符, 表明目标蛋白得到了高效表达 (图 5A)。将重组菌裂解后, 目标蛋白在菌体裂解液的上清液和沉淀中都能检测到, 但绝大部分存在于上清液中。由于 HBc 蛋白主要存在于上清液中, 因此, 我们选择了可溶性蛋白的纯化方法, 使用不同咪唑浓度梯度的 PB 缓冲液对 HBc 蛋白进行纯化。尽管获得了含量较高的 HBc(A80C) 蛋白, 但洗脱液中仍含有其他杂蛋白, 且流穿液中也存在着较高含量的 HBc(A80C) 蛋白, 调整洗脱液咪唑浓度亦不能改善这种情况 (图 5B)。我们推测在纯化过程中, HBc(A80C) 蛋白单体在 PB 缓冲液进行了自组装, His 亲和标签被包裹在内部, 难以结合到 Ni 亲和填料上, 因此, 我们将 6 mol/L 的尿素加入到缓冲体系中进行蛋白纯化, 希望通过尿素对蛋白可逆的变性作用, 使蛋白的聚合结构解开, 纯化标签得以暴露。通过这样的操作, 获得了较好的纯化效果, 目标蛋白得到了很好的

保留, 其他杂蛋白被有效地去除, 电泳结果显示 HBc(A80C) 蛋白经过纯化后, 条带单一 (图 5C)。Western blotting 结果显示, 两组平行样品都出现了目标条带, 且条带清晰, 而空白无样品对照组无特异性条带 (图 5D)。结果表明纯化后的 HBc(A80C) 单体蛋白能够与 Anti-HBcAg 抗体发生特异性结合, 进一步证明了纯化后的蛋白是 HBc(A80C) 目标蛋白, 且纯度较高。

2.3 HBc-VLPs 的形貌

纯化后, HBc(A80C) 蛋白单体在无尿素的缓冲液中能够自组装, 形成 HBc 类病毒样颗粒, 通过 Sepharose 凝胶柱层析, 可以除去未组装的 HBc(A80C) 单体或者未完全组装的多聚体蛋白, 获取较高纯度的 HBc 纳米微粒。马尔文激光粒度仪的测定数据显示, HBc 纳米微粒的平均粒径为 29.8 nm, 粒度分布均匀 (图 6), 与 HBc-VLPs 粒径的理论数值相符。

透射电子显微镜结果显示, 经过凝胶层析进一步纯化后的 HBc-VLPs 的直径约为 30 nm, 呈现较为均一的球形 (图 7), 这一结果也与粒度仪测定的数据相符。

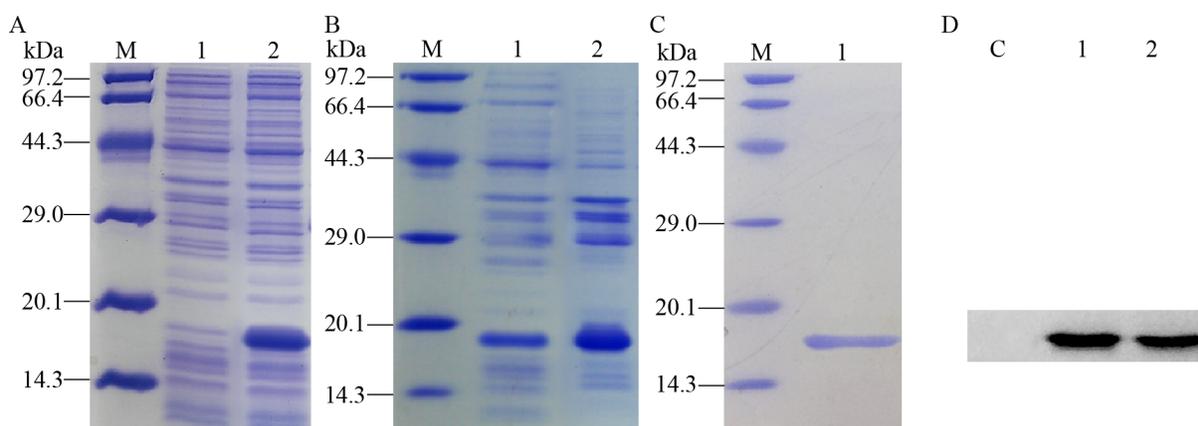


图 5 HBc(A80C) 蛋白表达、纯化的电泳分析

Fig. 5 Expression and purification of HBc(A80C) recombinant protein analyzed by PAGE. Lane M: low protein molecular weight marker. (A) Lane 1, 2: HBc(A80C) protein recombinant bacteria whole cell lysate before and after induction. (B) Lane 1: protein in the flow-through; Lane 2: HBc(A80C) protein after purification (phosphate buffer without urea). (C) Lane 1: HBc(A80C) protein after purification (phosphate buffer with 6 mol/L urea). (D) Lane C control group; Lane 1, 2: HBc(A80C) protein (detected by Western blotting).

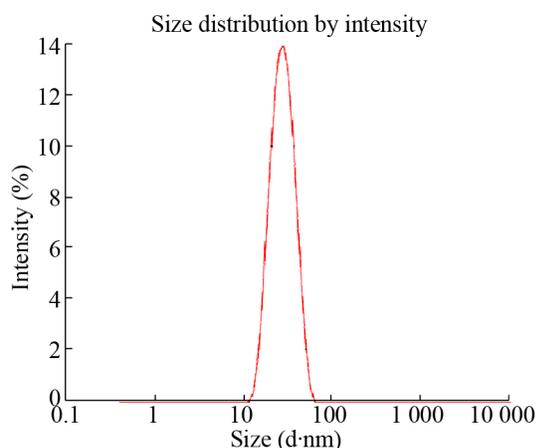


图 6 HBc-VLPs 的粒径及粒度分布

Fig. 6 Particle size and distribution of HBc-VLPs.

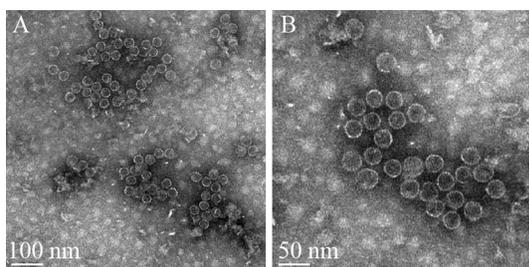


图 7 HBc-VLPs 透射电子显微镜照片

Fig. 7 Transmission electron microscope images of HBc-VLPs. (A) Observed using TEM at 300 000-fold magnification. (B) Observed using TEM at 400 000-fold magnification.

2.4 M2e-HBc-VLPs 的活细胞检验

为了验证 M2e 抗原肽是否连接到 HBc-VLPs 上,采用细胞荧光示踪的方法,使用交联后的 HBc 微粒 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 A549 和 HCT-116 两种癌细胞进行了处理。由于在 M2e 与 HBc-VLPs 的双向交联反应后采取了透析的方式进行处理,仅截留 HBc-VLPs 大分子,只有定点连接到 HBc-VLPs 上的抗原肽才会保留下来。M2e 抗原肽在合成之时,就对序列中的赖氨酸 Lys 进行了 FITC 标记, FITC 在 520 nm 激发光下能够发出黄绿色荧光。经过 10 h 的作用,在两种细胞中都能清楚地观察到绿色荧光 (图 8), 荧光分布较为均匀。这一结

果不但证明了 M2e 抗原肽交联到了 HBc-VLPs 抗原表位的指定位点,成功制备了模式疫苗 M2e-HBc-VLPs,而且验证了 HBc-VLPs 结构的完整性, HBc-VLPs 被细胞摄取,能够进入细胞内部。天然的乙肝病毒微粒能够通过细胞表面因子的相互作用进入细胞^[24],而纳米级别的病毒微粒通常可以通过细胞内吞作用被细胞摄取^[25],基于上述原因, HBc-VLPs 能够被细胞摄取。A549 是肺泡基底上皮样细胞,而 HCT-116 结构和功能类似于分化的小肠上皮细胞,将两种细胞作为上皮细胞模型,研究其对 HBc-VLPs 的摄取具有一定的代表性。M2e-HBc-VLPs 的制备在先前的研究中,往往采取融合表达的方式,虽然原核、真核表达体系都能够获得目标蛋白单体,但真核表达体系的成本较高,得率较低^[26],采用原核表达体系生产 HBc 融合蛋白仍是目前的主要选择。融合表达能够确保 HBc-VLPs 微粒的每一亚单元都包含目标抗原,但也受限于载入的抗原序列,过大或难以表达的氨基酸序列会降低单体蛋白的产率,也会影响病毒样颗粒的形成^[27]。相较于融合表达,定点偶联的方法具有独特的优势,不受限于偶联序列因素的影响,能够确保病毒样微粒结构的完整。

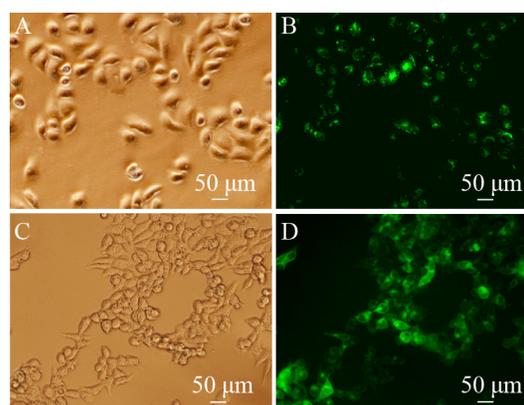


图 8 细胞对 M2e 与 HBc-VLPs 交联产物的摄取情况
Fig. 8 Crosslinking product of M2e and HBc-VLPs uptake by cells. (A, B) A549 cells treated with crosslinking products. (C, D) HCT-116 cells treated with crosslinking products. (A, C) were captured in bright field. (B, D) were captured in dark field.

2.5 免疫小鼠的 IgG 抗体应答

在 3 次免疫后, 单独的 M2e 抗原肽并没有使小鼠体内的 IgG 抗体含量明显增加, 这是由于多肽类抗原分子量较小, 免疫原性通常较弱, 难以激发较强的免疫反应^[28]。但是将 M2e 定点偶联到 HBc-VLPs 上就有显著的不同, 在血清中, M2e-HBc-VLPs 疫苗能够有效的诱导机体产生抗 M2e 特异性的 IgG 抗体, 抗原特异性 IgG 抗体变化较为明显, 差异显著 ($P < 0.01$)。在提高一倍免疫剂量后 (100 μg), 血清中的特异性抗体含量进一步提高, 差异显著 ($P < 0.01$), 结果如图 9 所示。上述结果表明, 模式抗原肽 M2e 通过 Cys 定点偶联到 HBc 主要免疫显性区域而制备成的 M2e-HBc-VLPs 疫苗能够有效刺激小鼠产生抗原特异性的 IgG 抗体, 激活了小鼠的系统免疫。

3 结论

HBc-VLPs 在形态、结构上与天然的病毒结构相似, 具有很强的免疫原性以及生物学活性, 是安全、有效的疫苗纳米载体, 具有重要的科学研究和临床应用价值。本研究借鉴抗体与药物的

偶联模式, 设计了一种能够实现与抗原定点偶联的 HBc-VLPs 载体。利用基因工程技术, 在 HBc-VLPs 的主要免疫显性区域引入一个 Cys 定点交联位点, 通过 Sulfo-SMCC 这种氨基-巯基双功能交联剂, 将含有 NH_2 的抗原或药物锚定于 HBc-VLPs 表面设计的 Cys 位点, 实现抗原或药物的定点连接, 再利用 HBc-VLPs 将它们运输到细胞内。相较于融合表达, 定点偶联的 HBc-VLPs 载体具有独特的优势: 一方面不会因为因融合序列而影响病毒微粒自组装时空结构的形成, 能够确保 HBc-VLPs 结构的完整; 另一方面能够连接一些分子量较大的多肽和蛋白, 以及一些含有难以表达氨基酸序列的多肽。通过物理性质的表征、细胞荧光示踪以及动物免疫等方式, 验证了疫苗载体 HBc-VLPs 的有效性。该方法能够应用于类似 VLPs 微粒的设计与制备, 为基于 HBc-VLPs 作为疫苗载体的研究奠定了基础, 能够促进基于 HBc-VLPs 载体疫苗的研发以及 HBc-VLPs 在其他领域的应用。

REFERENCES

- [1] Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61(3): 531–539.
- [2] Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Virus-like particles as particulate vaccines. *Curr HIV Res*, 2010, 8(4): 299–309.
- [3] Rosenthal JA, Chen LX, Baker JL, et al. Pathogen-like particles: biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 28: 51–58.
- [4] Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol Chem*, 2008, 389(5): 521–536.
- [5] Mohsen MO, Gomes AC, Cabral-Miranda G, et al. Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. *J Control Release*, 2017, 251: 92–100.
- [6] Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development. *Expert*

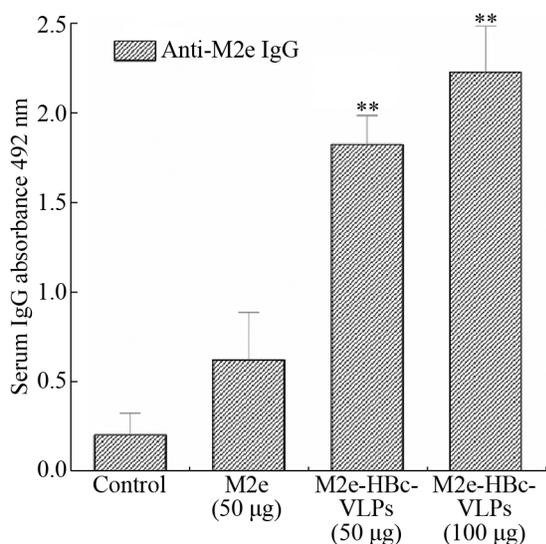


图 9 免疫后血清中抗 M2e 特异性 IgG 抗体的含量
Fig. 9 Serum M2e-specific IgG antibody levels in different groups after immunization. ** $P < 0.01$.

- Rev Vaccines, 2010, 9(10): 1149–1176.
- [7] Brune KD, Leneghan DB, Brian IJ, et al. Plug-and-display: decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci Rep*, 2016, 6: 19234.
- [8] Gomes AC, Mohsen M, Bachmann MF. Harnessing nanoparticles for immunomodulation and vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(1): E6.
- [9] Moser C, Amacker M, Kammer AR, et al. Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert Rev Vacc*, 2007, 6(5): 711–721.
- [10] Liu FX, Ge SQ, Li L, et al. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Res Vet Sci*, 2012, 93(2): 553–559.
- [11] Herzog C, Hartmann K, Künzi V, et al. Eleven years of Inflexal[®] V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine*, 2009, 27(33): 4381–4387.
- [12] Bovier PA. Epaxal[®]: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vacc*, 2008, 7(8): 1141–1150.
- [13] Atmar RL, Baehner F, Cramer JP, et al. Rapid responses to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: a randomized controlled trial. *J Infect Dis*, 2016, 214(6): 845–853.
- [14] Lindesmith LC, Mallory ML, Jones TA, et al. Impact of pre-exposure history and host genetics on antibody avidity following norovirus vaccination. *J Infect Dis*, 2017, 215(6): 984–991.
- [15] Goo L, Dowd KA, Lin TY, et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all chikungunya virus genotypes. *J Infect Dis*, 2016, 214(10): 1487–1491.
- [16] Ong HK, Tan WS, Ho KL. Virus like particles as a platform for cancer vaccine development. *PeerJ*, 2017, 5(S1): e4053.
- [17] Venkatakrisnan B, Zlotnick A. The structural biology of Hepatitis B virus: form and function. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 429–451.
- [18] Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnol*, 2017, 39: 174–180.
- [19] Zlotnick A, Palmer I, Kaufman JD, et al. Separation and crystallization of $T=3$ and $T=4$ icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 1999, 55(3): 717–720.
- [20] Mohsen MO, Zha LS, Cabral-Miranda G, et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*, 2017, 34: 123–132.
- [21] Jegerlehner A, Tissot A, Lechner F, et al. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*, 2002, 20(25/26): 3104–3112.
- [22] Zlotnick A, Cheng N, Conway JF, et al. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry*, 1996, 35(23): 7412–7421.
- [23] Nassal M, Rieger A, Steinau O. Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J Mol Biol*, 1992, 225(4): 1013–1025.
- [24] Watashi K, Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D virus entry, species specificity, and tissue tropism. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(8): a021378.
- [25] Zhang SL, Gao HJ, Bao G. Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano*, 2015, 9(9): 8655–8671.
- [26] Liu R, Li ZK. Eukaryotic expression of M2e-HBC fusion protein. *Shaanxi Med J*, 2011, 40(9): 1127–1130 (in Chinese).
刘蕊, 李志奎. M2e-HBC 融合蛋白的真核表达. *陕西医学杂志*, 2011, 40(9): 1127–1130.
- [27] Zhang XF, Hu FB, Ma XY, et al. Design, construction, characterization and preliminary activity research of universal influenza virus vaccine (Flu@ uV) delivered by Hepatitis B virus core protein (HBc-VLP). *China Biotechnol*, 2016, 36(2): 7–15 (in Chinese).
张旭凡, 胡发彪, 马兴元, 等. 由乙肝病毒核心蛋白 (HBc-VLP) 递载的流感通用疫苗 Flu@ uV 设计构建、表征及初步活性研究. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(2): 7–15.
- [28] Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*, 2016, 7(2): 842–854.

(本文责编 郝丽芳)