

含分子内佐剂的 SARS-CoV-2 RBD 域重组蛋白制备及免疫效果评价

蒋静雯^{1,3}, 王云龙^{2,3}, 李玉林³, 王继创³, 张怡青^{2,3}, 王旭东⁴, 王晓军⁴, 张恒⁴

1 郑州大学 生命科学学院, 河南 郑州 450001

2 郑州职业技术学院 生物工程系, 河南 郑州 450010

3 河南省生物工程技术研究中心, 河南 郑州 450010

4 河南省职工医院, 河南 郑州 450002

蒋静雯, 王云龙, 李玉林, 王继创, 张怡青, 王旭东, 王晓军, 张恒. 含分子内佐剂的 SARS-CoV-2 RBD 域重组蛋白制备及免疫效果评价. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3353-3362.

JIANG JW, WANG YL, LI YL, WANG JC, ZHANG YQ, WANG XD, WANG XJ, ZHANG H. Preparation and immunogenicity of recombinant protein containing intramolecular adjuvant in SARS-CoV-2 RBD domain. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3353-3362.

摘要: 制备含破伤风毒素肽 (tetanus toxin, TT)、促吞噬肽 (tuftsin) 和新型冠状病毒刺突蛋白 (spike, S 蛋白) 受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 的融合蛋白, 探讨分子内佐剂对 RBD 蛋白体液免疫和细胞免疫效果的影响。将破伤风毒素肽、促吞噬肽与 S 蛋白 RBD 区域通过柔性多肽串联, 密码子优化后构建重组载体, 原核表达纯化制备重组 S-TT-tuftsin 蛋白, 与铝佐剂混合后免疫 BALB/c 小鼠, 对其体液及细胞免疫效果进行评价。重组 S-TT-tuftsin 蛋白以包涵体形式表达, 离子交换层析纯化后采用梯度透析进行复性, 复性蛋白经 Dot blotting 鉴定, 可与新冠亚单位疫苗 (安徽智飞公司) 免疫后人血清发生反应。小鼠免疫实验结果表明, 免疫 35 d 时抗体水平到达平台期, 含分子内佐剂重组蛋白 (铝佐剂) 免疫小鼠后血清 ELISA 抗体效价高达 1:66 240, 显著高于 S-RBD 蛋白 (铝佐剂) 免疫小鼠抗体效价 ($P<0.05$)。同时, 含分子内佐剂重组蛋白刺激小鼠产生更强的淋巴细胞增殖能力, 刺激指数可达 4.71 ± 0.15 , 相较于 S-RBD 蛋白的刺激指数 1.83 ± 0.09 具有显著性差异 ($P<0.0001$)。分子内佐剂破伤风毒素肽和促吞噬肽可显著增强新冠 S 蛋白 RBD 域的体液免疫和细胞免疫效果, 可为新冠亚单位疫苗和其他病毒亚单位疫苗的研制提供理论基础和参考。

关键词: 分子内佐剂; 新型冠状病毒; 重组蛋白; 免疫

Received: November 30, 2021; **Accepted:** April 6, 2022; **Published online:** April 29, 2022

Supported by: SARS-CoV-2 Prevention and Control Emergency Scientific Research Project of Zhengzhou (2020YJGG0007)

Corresponding author: WANG Yunlong. E-mail: biowyl@126.com

基金项目: 郑州市新型冠状病毒防控应急科研攻关项目 (2020YJGG0007)

Preparation and immunogenicity of recombinant protein containing intramolecular adjuvant in SARS-CoV-2 RBD domain

JIANG Jingwen^{1,3}, WANG Yunlong^{2,3}, LI Yulin³, WANG Jichuang³, ZHANG Yiqing^{2,3}, WANG Xudong⁴, WANG Xiaojun⁴, ZHANG Heng⁴

1 School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 Department of Bioengineering, Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450010, Henan, China

3 Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450010, Henan, China

4 Henan Provincial Staff Hospital, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: A fusion protein containing a tetanus toxin peptide, a tuftsin peptide and a SARS-CoV-2S protein receptor-binding domain (RBD) was prepared to investigate the effect of intramolecular adjuvant on humoral and cellular immunity of RBD protein. The tetanus toxin peptide, tuftsin peptide and S protein RBD region were connected by a flexible polypeptide, and a recombinant vector was constructed after codon optimization. The recombinant S-TT-tuftsin protein was prepared by prokaryotic expression and purification. BALB/c mice were immunized after mixed with aluminum adjuvant, and the humoral and cellular immune effects were evaluated. The recombinant S-TT-tuftsin protein was expressed as an inclusion body, and was purified by ion exchange chromatography and renatured by gradient dialysis. The renatured protein was identified by Dot blotting and reacted with serum of descendants immunized with SARS-CoV-2 subunit vaccine. The results showed that the antibody level reached a plateau after 35 days of immunization, and the serum antibody ELISA titer of mice immunized with recombinant protein containing intramolecular adjuvant was up to 1:66 240, which was significantly higher than that of mice immunized with S-RBD protein ($P<0.05$). At the same time, the recombinant protein containing intramolecular adjuvant stimulated mice to produce a stronger lymphocyte proliferation ability. The stimulation index was 4.71 ± 0.15 , which was significantly different from that of the S-RBD protein (1.83 ± 0.09) ($P<0.000 1$). Intramolecular adjuvant tetanus toxin peptide and tuftsin peptide significantly enhanced the humoral and cellular immune effect of the SARS-CoV-2 S protein RBD domain, which provided a theoretical basis for the development of subunit vaccines for SARS-CoV-2 and other viruses.

Keywords: intramolecular adjuvant; SARS-CoV-2; recombinant protein; immunity

由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引起的疫情近两年已席卷全球^[1], 目前针对该病毒的治疗药物尚未全面普及, 随着病毒变异株陆续出现^[2], 国内外疫情形势依旧严峻复杂。开发针对传染性病原体的预防性疫苗是控制和阻止流

行病大规模暴发的关键^[3]。全球新型冠状病毒疫苗开发路线主要有灭活全病毒疫苗、核酸疫苗、亚单位疫苗、载体疫苗和减毒活疫苗^[4]。灭活疫苗能引起较强的体液免疫应答, 但细胞免疫应答反应较弱, 且生产过程中存在生物安

全风险^[5]。载体疫苗以病毒为载体感染细胞,诱导较强的体液和细胞免疫反应,但腺病毒载体本身可能存在免疫影响^[6]。核酸疫苗中 mRNA 疫苗相比 DNA 疫苗无需进入细胞核,相对更安全^[7]。mRNA 疫苗因其能引起强烈的细胞免疫和体液免疫反应而表现出极佳的保护效力^[8],但部分 mRNA 疫苗运输与保存条件较为苛刻^[9]。

重组亚单位疫苗基因和氨基酸序列明确,新型冠状病毒 S 蛋白 RBD 域对决定组织嗜性和宿主范围至关重要,是主要的中和表位区域,成为新型冠状病毒亚单位疫苗研发的首选靶蛋白^[10]。重组蛋白疫苗免疫原性弱,需要特定的佐剂来提升免疫效果^[11]。分子内佐剂是一类既具有抗原递呈功能又具有佐剂效果的小分子多肽,因其能特异性或非特异性增强细胞免疫应答成为重组蛋白疫苗的研究热点之一^[12]。疫苗研究中常用的分子内佐剂主要有流感病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP)^[13]、大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚基 (heat-labile enterotoxin B subunit, LTB)^[14]、破伤风毒素肽 (tetanus toxin, TT)^[15]、促吞噬肽 (tuftsin)^[16]等。本研究将两种分子内佐剂破伤风毒素肽 (TT₈₃₀₋₈₄₃)、促吞噬肽 (tuftsin) 与 S 蛋白 RBD 区域相串联,预期通过这两个肽的作用,增加 S 蛋白 RBD 区域 (S-RBD) 抗原的免疫反应,增强细胞免疫应答。

本试验通过柔性连接肽 GGG 将分子内佐剂与 S-RBD 区域相串联,采用原核表达系统对其表达纯化条件进行探究,得到纯度较高、复性效果较好的 S-TT-tuftsin 重组蛋白。重组蛋白与铝佐剂混合后免疫 BALB/c 小鼠,体液免疫应答结果表明 S-TT-tuftsin 重组蛋白刺激机体产生的 ELISA 抗体效价可达 1:66 240,细胞免疫应答结果显示 S-TT-tuftsin 重组蛋白对淋巴细胞特异性刺激增殖指数可达 4.71±0.15,免疫效

果证明了分子内佐剂 (TT₈₃₀₋₈₄₃与 tuftsin) 可刺激小鼠针对新冠 S-RBD 区域产生更强的体液免疫反应及细胞免疫应答,为新冠或其他病毒亚单位疫苗的研究提供理论基础和参考。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

实验动物 BALB/c 小鼠 (6 周龄) 购自郑州大学实验动物中心;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒购自索莱宝公司;二乙氨基乙基 (diethylaminoethyl, DEAE) Sepharose Fast Flow 离子交换层析介质购自 GE 公司;尿素、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司;S-RBD 蛋白、S-RBD 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG (羊抗鼠-HRP)、辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgG (鼠抗人-HRP)、新冠亚单位疫苗 (安徽智飞公司) 免疫人血清均由河南省生物工程技术研究中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白序列设计及在大肠杆菌中表达条件探究

参考 GenBank 上 SARS-CoV-2 病毒的 S 蛋白基因序列 (GenBank 登录号: YP_009724390.1), 选取 S 蛋白 RBD 区域 (319 aa-541 aa) 223 个氨基酸对应的基因序列作为目的基因,通过柔性连接肽 GGG 将目的基因与 TT₈₃₀₋₈₄₃、tuftsin 相连接 (连接方式如图 1 所示),交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成并连接到载体 pET28a 上。将重组质粒转入到大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*), 在 1 L 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0-1.2 之间时加入终浓度 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 37 °C、210 r/min 诱导表达 6 h, 7 000 r/min 离心 10 min 收菌。



图1 S-TT-tuftsins 重组抗原基因设计结构示意图

Figure 1 Structure diagram for designing the S-TT-tuftsins recombinant antigen gene.

1.2.2 重组蛋白洗涤、纯化与鉴定

向收集的菌体沉淀中加入 30 mL、20 mmol/L Tris 缓冲液，冰浴超声破碎（功率 300 W，工作时间 3 s，间歇时间 3 s）20 min，经 1% Triton X-100 洗涤 1 次，2 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris 缓冲液（pH 8.0）洗涤 1 次，最终得到溶于缓冲液 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris（pH 8.0）中的粗提蛋白。

粗提蛋白经 DEAE 阴离子交换柱（GE 公司）进行纯化，对重组蛋白洗脱液中盐离子的浓度进行探究。纯化时缓冲液为 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris（pH 8.0），洗脱液为 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris（pH 8.0），和 0、20、50、100、300 mmol/L 氯化钠。通过 SDS-PAGE 分析确定纯化时目的蛋白最佳洗脱条件。

对重组蛋白进行 Western blotting 鉴定。配制 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，采用河南省生物工程技术研究中心提供的 S-RBD 单克隆抗体（1:500）作为一抗，4 °C 孵育过夜，以羊抗鼠-HRP（1:3 000）作为二抗，室温孵育 2 h，随后配制 DAB 显色液进行显色。

1.2.3 重组蛋白复性与复性效果分析

采用梯度透析复性法对纯度较高的包涵体蛋白进行复性。复性温度 4 °C，复性液为 8 mol/L 尿素、20 mmol/L Tris（pH 8.0）、甘油、精氨酸。复性时对甘油及精氨酸的浓度进行探究，甘油浓度分别设为 5%、8%、10%，精氨酸浓度设为 0.1、0.3、0.5 mol/L。随后以牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）为阴性对照，真核

S-RBD 蛋白为阳性对照，实验室接种过新冠亚单位疫苗人血清（1:100）为一抗，鼠抗人-HRP（1:3 000）为二抗，Dot blotting 检测复性后重组蛋白的活性。

1.2.4 抗原免疫及特异性抗体测定

前期经实验探究，重组 S-TT-tuftsins 蛋白免疫剂量为 50 μg 时效果较好（具体结果略）。

将 15 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组，每组 5 只，分别为 PBS 组、S-RBD 组、S-TT-tuftsins 组。S-RBD 组与 S-TT-tuftsins 组各取 50 μL（50 μg）蛋白，PBS 组取 50 μL 灭菌的 PBS，分别与等体积的铝佐剂混合，皮下多点免疫小鼠。于首次免疫第 14 天按照上述程序进行第二次免疫。每 7 d 尾静脉取血并采用酶联免疫吸附法（ELISA 法）检测小鼠产生抗体的水平。

ELISA 法对免疫鼠血清抗体水平进行检测。包被蛋白为 S-RBD 抗原，免疫鼠血清抗体预稀释 1:50 倍后倍比稀释，对血清抗体效价进行检测。每孔加样 100 μL，37 °C 孵育 30 min 后 PBST 洗板 5 次（下同），随后加入羊抗鼠-HRP（1:6 000）每孔 100 μL，37 °C 孵育后洗板，再加入显色剂 A 与显色剂 B 各 50 μL，37 °C 孵育 20 min 后取出每孔加 50 μL 终止液，立即使用酶标仪双波长检测（450 nm 与 630 nm）。

1.2.5 免疫小鼠淋巴细胞增殖试验

免疫鼠血清抗体水平到达平台期时颈椎脱臼处死小鼠，于无菌条件下解剖取出脾脏，采用小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒分离出脾淋

巴细胞后进行细胞计数,并用 RPMI-1640 培养基稀释细胞后铺于 96 孔板,每孔铺 2×10^5 个细胞。使用终浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的相应抗原刺激淋巴细胞,同时以 $5 \mu\text{g/mL}$ 刀豆蛋白刺激作为阳性对照,无抗原刺激孔作为阴性对照,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 72 h。然后向每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK8 试剂,继续培养 4 h 后在酶标测定仪上用 450 nm 与 630 nm 波长(双波长检测)测定 OD 值。刺激指数(stimulation index, SI) = (刺激孔 OD_{630} - 刺激孔 OD_{450}) / (无抗原刺激孔 OD_{630} - 无抗原刺激孔 OD_{450})。

1.2.6 免疫鼠血清假病毒中和试验

假病毒购自义翘神州(货号:PSV001, HIV-1 系统),表面表达 SARS-CoV-2 Spike 蛋白,并携带有荧光素酶报告基因。将 PBS 组、重组 S-RBD 蛋白组、重组 S-TT-tuftsins 蛋白组免疫鼠血清从 1:2 开始倍比稀释至 1:256,取 $50 \mu\text{L}$ 稀释后血清与等体积的假病毒混合后孵育 1 h,将混合液添加到 hACE2-293T 细胞板(2×10^5 个细胞/孔)中,培养 48 h 后对每孔细胞中荧光素酶发光值(relative luciferase activity unit, RLU)进行检测。计算 RLU 值相对减少率, EC_{50} 值经 Graphpad Prism 8 软件“log (inhibitor) vs. response (four parameters)”四参数拟合分析得到。阳性对照为安徽智飞亚单位疫苗 3 针免疫 14 d 后的人血清。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白表达与纯化

对诱导前后菌液取样进行 SDS-PAGE 分析,结果显示, S-TT-tuftsins 诱导后样本泳道中在 29 kDa 处较诱导前样本条带明显(图 2 泳道 2、3),说明在 IPTG 的诱导下成功表达了 S-TT-tuftsins 重组蛋白,实验结果与预期相符。

经超声破碎后 SDS-PAGE 分析发现重组蛋

白以包涵体形式表达(图 2 泳道 4、5),随后对包涵体蛋白进行洗涤及 DEAE-阴离子交换层析纯化,在氯化钠浓度为 20 mmol/L 时收集到纯度较高的重组蛋白(图 2 泳道 6)。

2.2 抗原 Western blotting 鉴定

以 S-RBD 单克隆抗体作为一抗对重组蛋白进行 Western blotting 鉴定时,阴性对照 BSA 不显色, S-TT-tuftsins 与 S-RBD 重组蛋白均能与 S-RBD 单克隆抗体发生特异性反应而显色,且位置条带正确(图 3)。试验与预期结果相符。

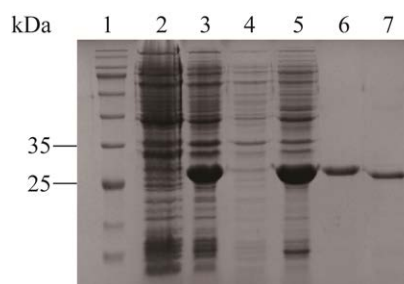


图 2 重组 S-TT-tuftsins 抗原表达纯化

Figure 2 Expression and purification of recombinant S-TT-tuftsins antigen. 1-6: recombinant S-TT-tuftsins antigen expression and purification. Lane information: 1: protein marker; 2: before induction; 3: after induction; 4: broken supernatant; 5: broken precipitate; 6: after purification; 7: recombinant S-RBD antigen.

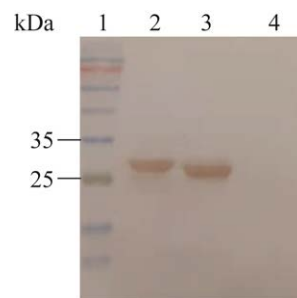


图 3 重组 S-TT-tuftsins 抗原与 S-RBD 抗原 Western blotting 鉴定结果图

Figure 3 Western blotting identification of recombinant S-TT-tuftsins antigen and S-RBD antigen. Lane information: 1: protein marker; 2: S-TT-tuftsins; 3: S-RBD; 4: BSA (negative control).

2.3 包涵体蛋白复性分析

经实验验证, 确定复性液中甘油浓度为 8%、精氨酸浓度为 0.3 mol/L 和 0.5 mol/L 时, 重组蛋白析出量最少, 最终确定 S-TT-tuftsins 重组蛋白复性液中甘油最佳浓度为 8%, 精氨酸最佳浓度为 0.3 mol/L。

以新冠亚单位疫苗免疫人血清作为一抗对重组蛋白的复性效果进行分析, Dot blotting 实验结果显示 (图 4), S-TT-tuftsins 与 S-RBD 重组蛋白均能与血清多克隆抗体特异性结合而显色, 阴性对照 BSA 不显色, 说明复性后的重组蛋白可用于后续免疫实验。

2.4 免疫鼠血清抗体 ELISA 检测

采用 ELISA 法对免疫 42 d 内每组小鼠抗体效价进行检测, 以每组小鼠抗体效价均值作图 (图 5)。结果显示, 在免疫的各个时期 S-TT-tuftsins 组抗体效价均高于 S-RBD 组, 且二次免疫后抗体水平明显升高。首次免疫后 35 d 时, 抗体水平到达平台期, S-RBD 组 ELISA 抗体效价仅为 1:35 360, 而 S-TT-tuftsins 组 ELISA 抗体效价达到 1:66 240, 显著高于 S-RBD 组 ELISA 抗体效价 ($n=5, P<0.05$)。实验结果表明, 重组 S-TT-tuftsins 蛋白诱导小鼠产生特异性抗体的水平明显强于 S-RBD 蛋白。

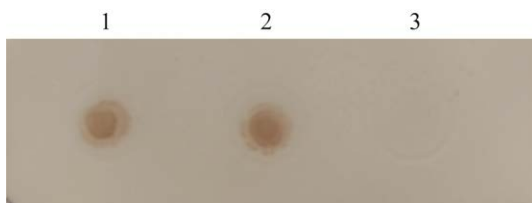


图 4 重组 S-TT-tuftsins 抗原与 S-RBD 抗原 Dot blotting 鉴定结果

Figure 4 Diagram of Dot blotting identification results of recombinant S-TT-tuftsins antigen and S-RBD antigen. The channel information: 1: S-TT-tuftsins; 2: S-RBD; 3: BSA (negative control).

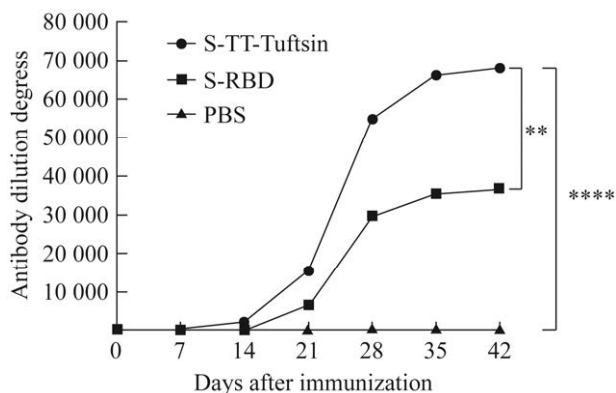


图 5 抗原免疫 42 d 内抗体水平检测

Figure 5 Profiles of antibody levels within 42 days of antigen immunization. **: $P<0.01$; ***: $P<0.0001$.

2.5 淋巴细胞增殖试验

通过抗体水平到达平台期时免疫鼠的脾淋巴细胞增殖试验来反映抗原特异性刺激小鼠体内淋巴细胞增殖情况。从图 6 可以看出, 重组 S-TT-tuftsins 蛋白刺激免疫鼠淋巴细胞增殖的能力较强, 刺激指数 SI 可达 4.71 ± 0.15 , 而 S-RBD 抗原刺激指数仅为 1.83 ± 0.09 。通过统计学分析, 重组 S-TT-tuftsins 蛋白特异性刺激淋巴细胞增殖能力显著强于 S-RBD 抗原 ($n=5, P<0.0001$)。

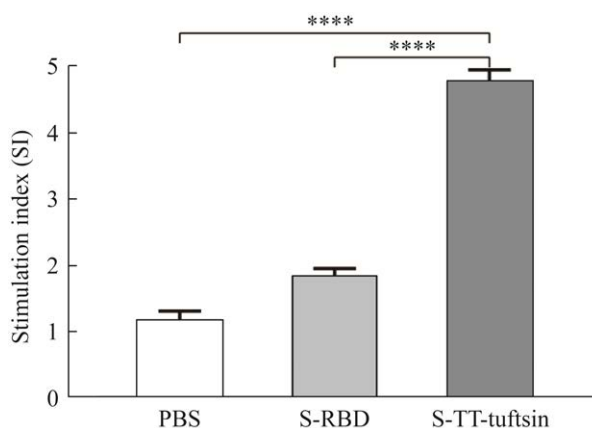


图 6 免疫鼠特异性刺激淋巴细胞增殖能力

Figure 6 Immunized mice specifically stimulate the proliferation ability of lymphocytes. ****: $P<0.0001$

2.6 免疫鼠血清假病毒中和试验

样品的稀释度经对数变换后与抑制率之间存在典型的四参数抑制曲线(图 7), EC_{50} 值由 Graphpad Prism 8 软件分析得到。与 PBS 组免疫鼠血清(阴性对照)对比, 阳性对照中和抗体活性为 1:43, 重组 S-TT-tuftsins 蛋白免疫鼠血清中和抗体活性为 1:29。结果表明, 制备的重组 S-TT-tuftsins 蛋白免疫鼠血清具有一定的中和活性。

3 讨论

安全有效的疫苗^[17]对抗击新型冠状病毒肺炎全球大流行至关重要。重组疫苗是新型冠状病毒疫苗研制的重要方向之一, 无论从结构还是序列选择上基本都锚定新型冠状病毒主要结构蛋白 S 蛋白或其上部分序列^[18-20], 且在动物实验^[21]或临床试验^[22]中均表现出较好的保护性免疫效果。重组纳米疫苗的研究也在应对新冠疫情中迅速发展, 其中美国诺瓦瓦克斯自主研发的重组纳米疫苗^[23]已在临床试验中得到较好的免疫原性与安全性。有关佐剂的研究也同样对疫苗研发起到推动作用, 用于新冠疫苗的佐

剂有铝佐剂、AS03^[24]、CpG^[25]以及一些新型佐剂^[26]等, 均在不同程度上增强疫苗的免疫效果及中和抗体水平。重组疫苗除了可以起到免疫保护性作用之外, 疫苗的安全性^[27]也是人们同样关注的问题。临床研究中, 仅有部分受试者接种疫苗后出现暂时性局部不良反应^[28], 且在未加干预的情况下可自行消除。这表明, 在现有研究基础上, 重组疫苗在应对疫情的作用上是安全且有效的。

SARS-CoV-2 病毒上的 RBD 区域决定组织嗜性和宿主范围, 具有关键中和表位^[29], 是研制多种新型冠状病毒疫苗的首选靶标, 且目前进行临床试验或上市的新型冠状病毒重组蛋白疫苗、mRNA 疫苗和病毒载体疫苗部分以 RBD 区域为主要抗原^[30], 且有研究表明, 选择 RBD 作为抗原与选择 S 蛋白作为抗原的 mRNA 疫苗在保护率和针对变异病毒的有效率并无明显差异^[31]。为进一步提高重组蛋白的免疫效果, 研究者通常借助通用 T 细胞表位的辅助作用, 克服不同人群的主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的限制, 进而诱导更强的免疫反应, 且通用表位相对分子质量应尽可能小, 避免机体产生针对表位的特异性抗体^[32]。破伤风毒素 (tetanus toxin, TT) 是细菌产生的一种单链多肽, 其 p2 表位 TT₈₃₀₋₈₄₃ 可与 MHC 蛋白结合, 在不同的疫苗平台上已被用作免疫系统的通用佐剂表位^[33], 可增强抗原性和整体免疫应答^[34]。研究表明, 将 TT 肽与胃泌素蛋白相连接制备新型抗胃泌素疫苗, 有效地增强了抗原表位本身的体液免疫和细胞免疫应答^[35]。促吞噬肽 (tuftsins) 是一种天然的免疫刺激四肽 (TKPR), 已被证实可以增加巨噬细胞介导的吞噬作用、脾细胞增殖^[36], 将 tuftsins 作为分子内佐剂融合表达既能保持结构稳定且可大幅度提升亚单位疫苗的免疫效果^[37]。

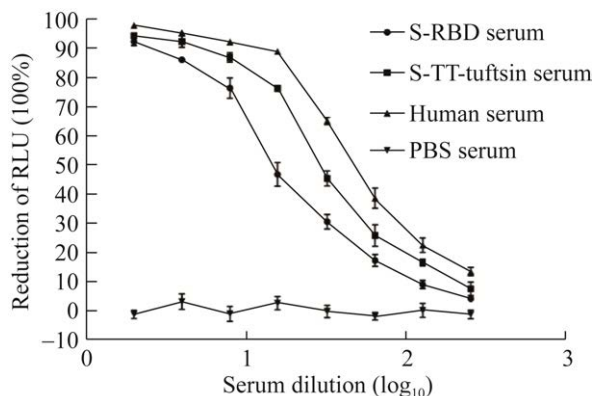


图 7 免疫鼠血清假病毒中和结果

Figure 7 Pseudovirus neutralization in immunized mouse serum.

考虑到抗原标签切除时,可能存在因残留的标签或蛋白酶引发安全性等问题^[38],实验设计了无标签的抗原,通过包涵体蛋白的洗涤与离子交换层析来提高重组蛋白的纯度。重组蛋白梯度透析复性时最佳复性液组合为 8%甘油与 0.3 mol/L 精氨酸^[39],对重组蛋白的聚集起到一定的抑制作用,有利于重组蛋白的正确折叠。Dot blotting 实验的结果表明了制备的重组蛋白复性时折叠效果较好。本研究设计将 TT₈₃₀₋₈₄₃、tuftsin 分子内佐剂与 S 蛋白 RBD 区域串联,进而提高 S-RBD 抗原的免疫原性,动物免疫及淋巴细胞增殖实验的数据也验证了这一设计的有效性。ELISA 检测结果表明,抗体水平到达平台期时(免疫 35 d),重组 S-TT-tuftsin 蛋白组诱导小鼠产生特异性抗体的效价为 1:66 240,显著高于 S-RBD 蛋白组 ($P<0.05$)。CCK8 实验结果表明,重组 S-TT-tuftsin 蛋白特异性刺激淋巴细胞增殖的指数为 4.71 ± 0.15 ,S-RBD 蛋白的刺激指数仅为 1.83 ± 0.09 ,重组 S-TT-tuftsin 蛋白特异性刺激淋巴细胞增殖的能力显著强于 S-RBD 蛋白 ($P<0.000 1$),说明在 TT₈₃₀₋₈₄₃ 和 tuftsin 分子内佐剂作用下,重组 S-TT-tuftsin 蛋白诱导小鼠产生了更强的细胞免疫应答,实验结果与预期设计相符。Su 等^[40]设计将 S 蛋白抗原与分子内佐剂联合使用,结果发现新型抗原可以刺激机体获得更高水平的中和抗体,也进一步验证了分子内佐剂在提升抗原免疫效果中的作用。

综上所述,分子内佐剂 TT₈₃₀₋₈₄₃ 和 tuftsin 可诱导新型冠状病毒 S-RBD 重组亚单位蛋白在小鼠体内产生更强的体液免疫和细胞免疫,有望成为新型冠状病毒肺炎重组蛋白疫苗的候选抗原。由于实验条件有限,重组蛋白免疫小鼠后活病毒中和实验未能进行检测,后续我们还将进一步探究分子内佐剂在 S-RBD 基因序列上

的位点及组合方式对免疫效果的影响,为新型冠状病毒及其他病毒亚单位疫苗的研制提供参考。

REFERENCES

- [1] Li G, Li WP, Fang XL, et al. Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. *Protein Expr Purif*, 2021, 186: 105908.
- [2] 白静. 新冠病毒变异株的特点和防控. *中国科技产业*, 2021(9): 22-23.
Bai J. Characteristics and prevention and control of new coronavirus mutant strains. *Sci Technol Ind China*, 2021(9): 22-23 (in Chinese).
- [3] 李霖, 吴乐阳, 殷兴鹏, 等. 新冠疫苗研发现状与新思路. *药物生物技术*, 2021, 28(4): 395-399.
Li L, Wu YY, Yin XP, et al. Development and new thinking on covid-19 vaccine. *Pharm Biotechnol*, 2021, 28(4): 395-399 (in Chinese).
- [4] 杨利敏, 田德雨, 刘文军. 新型冠状病毒疫苗研究策略分析. *生物工程学报*, 2020, 36(4): 593-604.
Yang LM, Tian DY, Liu WJ. Strategies for vaccine development of COVID-19. *Chin J Biotech*, 2020, 36(4): 593-604 (in Chinese).
- [5] Deng Y, Lan JM, Bao LL, et al. Enhanced protection in mice induced by immunization with inactivated whole viruses compare to spike protein of middle east respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 1-10.
- [6] Xu F, Wu SP, Yi LN, et al. Safety, mucosal and systemic immunopotency of an aerosolized adenovirus-vectored vaccine against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 438-441.
- [7] Silveira MM, Moreira MSG, Mendonça M. DNA vaccines against COVID-19: perspectives and challenges. *Life Sci*, 2021, 267: 118919.
- [8] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [9] Soleimanpour S, Yaghoubi A. COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go? *Expert Rev Vaccines*, 2021, 20(1): 23-44.
- [10] Wu YT, Huang XF, Yuan LZ, et al. A recombinant spike protein subunit vaccine confers protective

- immunity against SARS-CoV-2 infection and transmission in hamsters. *Sci Transl Med*, 2021, 13(606): eabg1143.
- [11] Dai LP, Zheng TY, Xu K, et al. A universal design of *Betacoronavirus* vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 2020, 182(3): 722-733.e11.
- [12] 雷鑫. 基于不同分子内佐剂的 A 型、O 型口蹄疫病毒二价多表位免疫原的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- Lei Y. Preliminary study on the bivalent multi-epitope immunogen against foot-and-mouth disease virus type A and O based on different built-in adjuvants[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [13] 张风华, 周鹏, 邵佳慧, 等. 流感病毒 NP 表位序列增强 H7N9 HA DNA 疫苗免疫效果研究. *激光生物学报*, 2019, 28(6): 529-534.
- Zhang FH, Zhou P, Shao JH, et al. The immune enhancing effect of influenza virus H7N9 HA DNA vaccine with NP epitope sequence. *Acta Laser Biol Sin*, 2019, 28(6): 529-534 (in Chinese).
- [14] 施金谷. 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)对罗非鱼链球菌口服疫苗免疫增强效果的初步研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
- Shi JG. The effects of heat-labile enterotoxin B subunit of *Escherichia coli* (LTB) on oral vaccination of *S. iniae* in tilapia[D]. Nanning: Guangxi University, 2013 (in Chinese).
- [15] Cai H, Chen MS, Sun ZY, et al. Self-adjuvanting synthetic antitumor vaccines from MUC₁ glycopeptides conjugated to T-cell epitopes from tetanus toxoid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(23): 6106-6110.
- [16] Fridkin M, Najjar VA. tuftsin: its chemistry, biology, and clinical potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1989, 24(1): 1-40.
- [17] Yang LM, Tian DY, Han JB, et al. A recombinant receptor-binding domain in trimeric form generates protective immunity against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. *Innovation (N Y)*, 2021, 2(3): 100140.
- [18] Dalvie NC, Rodriguez-Aponte SA, Hartwell BL, et al. Engineered SARS-CoV-2 receptor binding domain improves manufacturability in yeast and immunogenicity in mice. *PNAS*, 2021, 118(38): e2106845118.
- [19] Yang JY, Wang W, Chen ZM, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*, 2020, 586(7830): 572-577.
- [20] He C, Yang JY, He XM, et al. A bivalent recombinant vaccine targeting the S1 protein induces neutralizing antibodies against both SARS-CoV-2 variants and wild-type of the virus. *MedComm*, 2021, 2(3): 430-441.
- [21] Sun SH, He L, Zhao ZP, et al. Recombinant vaccine containing an RBD-Fc fusion induced protection against SARS-CoV-2 in nonhuman primates and mice. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(4): 1070-1073.
- [22] Richmond P, Hatchuel L, Dong M, et al. Safety and immunogenicity of S-Trimer (SCB-2019), a protein subunit vaccine candidate for COVID-19 in healthy adults: a phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2021, 397(10275): 682-694.
- [23] Dunkle LM, Kotloff KL, Gay CL, et al. Efficacy and safety of NVX-CoV2373 in adults in the United States and Mexico. *N Engl J Med*, 2022, 386(6): 531-543.
- [24] Bravo L, Smolenov I, Han HH, et al. Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: a phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2022, 399(10323): 461-472.
- [25] Liang JG, Su DM, Song TZ, et al. S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1346.
- [26] Peng H, Fu YX. Innovative adjuvant augments potency of a SARS-CoV-2 subunit vaccine. *Cell Res*, 2022: *Cell Res*, 32(4): 331-332.
- [27] Stuart ASV, Shaw RH, Liu XX, et al. Immunogenicity, safety, and reactogenicity of heterologous COVID-19 primary vaccination incorporating mRNA, viral-vector, and protein-adjuvant vaccines in the UK (Com-COV₂): a single-blind, randomised, phase 2, non-inferiority trial. *Lancet*, 2022, 399(10319): 36-49.
- [28] Yang SL, Li Y, Dai LP, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(8): 1107-1119.
- [29] Noorimotlagh Z, Karami C, Mirzaee SA, et al. Immune and bioinformatics identification of T cell and B cell epitopes in the protein structure of SARS-CoV-2: a systematic review. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106738.

- [30] Min L, Sun Q. Antibodies and vaccines target RBD of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 671633.
- [31] Chen GL, Li XF, Dai XH, et al. Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 ARCoV mRNA vaccine in Chinese adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Microbe*, 2022, 3(3): e193-e202.
- [32] Sinigaglia F, Guttinger M, Kilgus J, et al. A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature*, 1988, 336(6201): 778-780.
- [33] Brandt AAML, Rodrigues-Da-Silva RN, Lima-Junior JC, et al. Combining well-tempered metadynamics simulation and SPR assays to characterize the binding mechanism of the universal T-lymphocyte tetanus toxin epitope TT830-843. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 5568980.
- [34] Wu FB, Huang Y, Zhang P, et al. Interleukin-13 peptide vaccine induces protective humoral immunity in murine asthma models. *Oncotarget*, 2017, 9(6): 6678-6690.
- [35] He Q, Gao H, Gao M, et al. Immunogenicity and safety of a novel tetanus toxoid-conjugated anti-gastrin vaccine in BALB/c mice. *Vaccine*, 2018, 36(6): 847-852.
- [36] Dutta T, Garg M, Jain NK. Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34(2/3): 181-189.
- [37] Horváti K, Pályi B, Henczkó J, et al. A convenient synthetic method to improve immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* related T-cell epitope peptides. *Vaccines*, 2019, 7(3): 101.
- [38] 任军. 炭疽、鼠疫基因工程联合疫苗的前期研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009. Ren J. Prophase research on the genetic engineering combined vaccine of *Anthrax* and plague[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2009 (in Chinese).
- [39] Zhao DW, Liu YD, Zhang GF, et al. Interaction of arginine with protein during refolding process probed by amide H/D exchange mass spectrometry and isothermal titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta (BBA) Proteins Proteom*, 2015, 1854(1): 39-45.
- [40] Su QD, Zou YN, Yi Y, et al. Recombinant SARS-CoV-2 RBD with a built in T helper epitope induces strong neutralization antibody response. *Vaccine*, 2021, 39(8): 1241-1247.

(本文责编 陈宏宇)