DOI:10.13350/j.cjpb.230101 · 论著 ·

基于昆虫细胞-杆状病毒表达系统的 SARS-CoV-2 S1 蛋白的高效表达

张如悦[1],高耀荣[2],王建超[2],曹磊[1],张艳敏[1],张炜坚[1],彭雯娟[3],谭文松[1,3],赵亮[1,3]*
(1.华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237;2.上海杰威医药科技有限公司;3.上海倍谙基生物科技有限公司)

【摘要】 **目的** 设计、构建表达新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2) S1 蛋白的重组杆状病毒,建立并优化其在昆虫细胞中的生产工艺,为新型冠状病毒肺炎(COVID-19)血清学诊断方法的建立及疫苗开发奠定基础。 **方法** 利用分子克隆技术将 S1 基因插入 pFastBac™ 1 质粒,获得重组质粒 pFastBac-S1,经转座获得重组杆粒 rbacmid-S1,转染 Sf9 细胞后包装获得重组杆状病毒 rBV-S1,通过 rBV-S1 感染 High Five™(Hi5)细胞表达 S1 蛋白,使用 Western blot 分析鉴定 S1 蛋白的表达。在此基础上,建立优化 rBV-S1 扩增和蛋白表达的工艺,以实现 S1 蛋白的高效表达。 **结果** 通过特异性引物 PCR 扩增重组质粒 pFastBac-S1 与重组杆粒 rbacmid-S1,获得大小分别为 2 367 bp、4 370 bp 的基因片段,表明 S1 基因成功克隆入 pFastBac™ 1 质粒与 bacmid;采用 Western blot 分析细胞培养上清液,在 78 ku 处有特异性反应条带,证明在昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统(Insect cell-baculovirus expression vector system,IC-BEVS)中成功表达有反应原性的 S1 蛋白。Sf9 细胞以 1.5×10^6 cells/mL 接种,MOI=0.01 接毒,96 hpi 可收获最大病毒滴度为(8.40±0.16)$lgTCID_{50}$/mL;Hi5 细胞以 0.8×10^6 cells/mL 接种后培养 36 h,以 MOI=1 接毒,48 hpi 可获得最大 S1 蛋白产量为(4.33±0.09) mg/L。 **结论** 利用 IC-BEVS 成功表达了 S1 蛋白,并建立了优化的 S1 蛋白生产工艺,实现了 S1 蛋白的高效表达,对 COVID-19 临床诊断方法的建立及疫苗开发具有重要意义。

【关键词】 新型冠状病毒(SARS-CoV-2);新型冠状病毒肺炎(COVID-19);S1 蛋白;昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统
【中图分类号】 R373.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2023)01-0001-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jan;18(1):1-5,11.]

High-yield production of SARS-CoV-2 S1 using insect cell-baculovirus expression vector system

ZHANG Ru-yue[1], GAO Yao-rong[2], WANG Jian-chao[2], CAO Lei[1], ZHANG Yan-min[1], ZHANG Wei-jian[1], PENG Wen-juan[3], TAN Wen-song[1,3], ZHAO Liang[1,3] (1. *State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai* 200237, *China*; 2. *Shanghai Genvac Medical Technology Co., Ltd*; 3. *China*; *Shanghai Bioengine Sci-Tech Co., Ltd*)*

【Abstract】 **Objective** To design and construct a recombinant baculovirus expressing the S1 protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2(SARS-CoV-2), establish and optimise its production process in insect cells, and thus providing a new option for the establishment of serological assays and the development of vaccines for COVID-19. **Method** The S1 gene was inserted into pFastBac™ 1 plasmid using molecular cloning technique to obtain the recombinant plasmid pFastBac-S1, and the recombinant rbacmid-S1 was obtained by transposition. Sf9 cells were transfected with rbacmid-S1 and then packaged to obtain recombinant baculovirus rBV-S1. High Five™(Hi5) cells were infected by the rBV-S1 to express S1 protein which was later identified using Western blotting. On this basis, the multiplicity of infection (MOI) and time of harvest(TOH) of the recombinant baculovirus amplification process were optimized, and the cell lines, MOI, time of infection(TOI) and TOH of the S1 protein expression process were optimized. **Result** PCR with specific primers amplified the recombinant plasmid pFastBac-S1 and the recombinant bacmid-S1, obtaining fragments of 2 367 bp and 4 370 bp respectively, indicating that the S1 gene was successfully cloned into the pFastBac™ 1 plasmid and bacmid. Western blotting of the cell culture supernatant showed a specific reaction band at 78 ku, demonstrating the successful expression of the reactogenic S1 protein using the insect cell-baculovirus expression vector system (IC-BEVS). For amplification of rBV-S1, the optimal process was to inoculate Sf9 cells at 1.5×10^6 cells/mL, infect with MOI=0.01 and harvest end point at 96 hpi, thus achieving a maximum virus titer of (8.40±0.16) $lgTCID_{50}$/mL. For the S1 protein production, the optimal process was to inoculate Hi5 cells at 0.8×10^6 cells/mL and culture for 36 h, infect with MOI=1 and harvest at 48 hpi, thus obtaining a maximum S1 protein yield of (4.33±0.09) mg/L. **Conclusion** By using IC-

* 【通讯作者】 赵 亮,E-mail:zhaoliang@ecust.edu.cn
【作者简介】 张如悦(1996-),女,浙江宁波人,硕士研究生。研究方向:动物细胞与组织工程。E-mail:y45190734@mail.ecust.edu.cn

BEVS, we have successfully expressed the S1 protein and optimized its production process achieving high expression, which is important for the establishment of clinical diagnosis methods and the development of vaccines of COVID-19.

【Key words】 SARS-CoV-2; COVID-19; S1 protein; Insect cell-baculovirus expression vector system

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起,对全人类的健康、生命安全及社会经济发展带来严重影响。SARS-CoV-2是一种单链正链RNA病毒,包含4种结构蛋白,包括刺突蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)、包膜蛋白(envelope, E)和核衣壳蛋白(nuclocapsid, N)[1]。全长S蛋白包含两个功能亚基,分别为S1与S2亚基。S1亚基含受体结合域(receptor-binding domain, RBD),负责识别并结合宿主细胞表面受体。S2亚基负责介导病毒与宿主细胞的膜融合[2]。由于S糖蛋白暴露于病毒表面并介导病毒进入宿主细胞,因此S蛋白是感染后中和抗体的主要靶标,也是制备COVID-19血清学诊断试剂盒及蛋白疫苗的首选蛋白。目前对于SARS-CoV-2 S蛋白的生产主要集中于S全长蛋白或RBD蛋白[3,4],对S1蛋白高效表达的研究鲜有报导。然而S1蛋白可引起强烈免疫反应,且其在血清学检测中对COVID-19抗体的敏感性和特异性均高于S全长蛋白及RBD蛋白[5]。此外,S1蛋白作为亚单位疫苗比RBD蛋白可诱导产生更高的抗体水平[6]。因此,S1蛋白的高效表达对COVID-19血清学诊断试剂盒和疫苗开发有重要意义,而建立经济高效适合大规模生产的工艺是其成功应用的必要基础。目前,S1蛋白虽然已在原核表达系统[6]、哺乳动物表达系统[7]、杆状病毒表达载体系统(insect cell-baculovirus expression vector system, IC-BEVS)[8]中尝试进行了表达,主要研究其免疫原性,对其适合大规模生产的高效表达工艺尚未受到关注,未能充分证实其应用的可行性。原核表达系统缺乏翻译后修饰和有内毒素风险,哺乳动物表达系统蛋白生产周期长且生产成本高[9]。因此,为了建立适合S1蛋白的实际生产应用高效工艺,本研究选择具备生物安全性高、构建技术成熟、易规模放大、成本低、易获批等优点的IC-BEVS系统进行S1蛋白的表达。

IC-BEVS生产重组蛋白是一个多阶段过程,为保证重组蛋白在IC-BEVS中的高效生产,需获得高质量病毒及高活力细胞,因此需要对杆状病毒扩增过程及重组蛋白表达过程进行工艺优化。在该过程中,细胞系选择会显著影响最终杆状病毒与蛋白产量,除细胞系与杆状病毒本身所具备的生产能力外,感染复数(multiplicity of infection, MOI)、感染时间(time of infection, TOI)及收获时间(time of harvest, TOH)也是产量的显著影响因素[10]。在实际生产中,MOI影响重组病毒的产量和质量以及重组蛋白的表达量,但通常受到生产所需制备病毒总量的限制,因此必须在生产工艺的建立和优化中予以考虑。在批培养过程中,不同的TOI条件下细胞状态、密度以及培养环境均不同,因此不同TOI的选择会影响最终目的蛋白的产量。TOH的选择可影响蛋白生产时间,对于存在蛋白降解现象的过程而言,TOH的选择还影响最终收获蛋白的产量。

为了实现S1蛋白的高效表达,建立其适合大规模生产的高效工艺,证实其进行生产应用的可行性,本研究采用IC-BEVS系统表达S1蛋白,并建立S1蛋白的生产流程,对关键工艺参数进行优化,以实现S1蛋白的高效表达,为S1蛋白的高效生产提供科学指导,为SARS-CoV-2血清学诊断方法的建立及疫苗开发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒、菌株、细胞及培养基 pFastBac™ 1质粒,MAX Efficiency™ DH10Bac大肠埃希菌株及Opti-MEM™ I减血清培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DH5α大肠埃希菌感受态购自上海昂羽生物技术有限公司;Sf9细胞和High Five™(Hi5)细胞由上海倍谙基生物科技有限公司提供;Vigor™ S100S无血清培养基购自上海倍谙基生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 ExpiFectamine Sf转染试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;*ProteinFind* Anti-His Mouse Monoclonal Antibody,限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)股份有限公司;HRP-山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体购自苏州博特龙免疫技术有限公司;SARS-CoV-2 S1蛋白标准品和SARS-CoV-2 S1抗体购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;HRP偶联抗His标签单抗购于美国Proteintech Group公司;DNA回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据S1蛋白对应的基因序列

设计引物用于目的基因扩增。S1-F：5′-ATCGGGCGCGGATCCATGAAA TTCTTAGTCAACGTTGCC-3′；S1-R：5′-CTTCTCGACAAGCTTATGATGATGATGATGATGACGTG-3′。菌落PCR引物用于重组质粒pFastBac-S1的验证。pFastBac-S1-F：5′-GGTTGGCTACGTATACTCCGGAATA-3′；pFastBac-S1-R：5′-ATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAG-3′。M13引物用于rbacmid-S1验证。M13-F：5′-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3′；M13-R：5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′。以上引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

2.2 重组供体质粒pFastBac-S1的构建 根据GenBank中SARS-CoV-2 S蛋白全长基因序列(序列号：NC_045512.2)得到S1蛋白基因序列，并在5′端引入蜜蜂毒素信号肽序列，3′端引入6×His标签，由苏州金唯智生物科技有限公司合成。S1蛋白基因使用S1-F与S1-R特异性引物扩增，引入酶切位点与pFastBac™ 1质粒同源臂，pFastBac™ 1质粒使用BamHⅠ与HindⅢ进行双酶切，酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后，使用DNA回收试剂盒进行胶回收。回收的S1蛋白基因扩增片段及pFastBac™ 1酶切片段使用同源重组方法连接，连接产物转化DH5α大肠埃希菌感受态，在含Amp^+的LB平板上培养12 h，挑取单菌落使用pFastBac-S1-F与pFastBac-S1-R引物进行菌落PCR，经1%琼脂糖凝胶电泳验证片段大小。选择验证正确的重组菌单菌落置于装有8 mL液体LB培养基的离心管中进行摇菌培养，取菌液交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.3 重组杆粒rbacmid-S1的构建 将重组pFastBac-S1质粒转化DH10Bac大肠埃希菌，在含三抗(含有50 mg/L卡那霉素、7 mg/L庆大霉素、10 mg/L四环素、100 mg/L Bluo-gal与40 mg/L IPTG)的LB平板上进行蓝白斑筛选。挑取白色单菌落在上述三抗平板中再次验证，挑取再次验证后的白色单菌落置于4 mL含有50 mg/L卡那霉素、7 mg/L庆大霉素、10 mg/L四环素的液体LB培养基中进行摇菌，培养12 h后使用杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒提取重组bacmid，使用M13-F与M13-R引物进行PCR鉴定及1%琼脂糖凝胶电泳验证，验证正确的PCR产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.4 重组杆状病毒rBV-S1的制备 使用ExpiFectamine Sf转染试剂将rbacmid-S1转染Sf9细胞，于27 ℃培养96 h后收获上清，获得重组rBV-S1。获得的重组杆状病毒在Sf9细胞中扩增至P3代用于蛋白表达。

2.5 S1蛋白的表达及Western blot分析 使用终点稀释法测定杆状病毒滴度，使用P3代rBV-S1以MOI=1感染细胞密度为2×10^6 cells/mL的Hi5细胞，在27 ℃、130 r/min条件下培养72 h，细胞培养物于2000 r/min(离心半径16 cm)离心5 min，收获上清液为S1蛋白样品。取S1蛋白样品进行10% SDS-PAGE电泳，转膜后使用1∶5 000稀释的*ProteinFind* Anti-His Mouse Monoclonal Antibody作为一抗，1∶5 000稀释的HRP-山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体作为二抗进行Western blot，使用ECL显色后拍照。

2.6 rBV-S1扩增工艺优化 Sf9细胞以1.5×10^6 cells/mL接种至125 mL摇瓶，工作体积为30 mL，分别以MOI=0.001、0.01、0.1、1接毒，于27 ℃、130 r/min条件下培养至细胞活率<20%时结束培养，每隔24 h取样计数，从48 hpi(感染后小时数)开始留无菌样用于重组杆状病毒滴度检测。

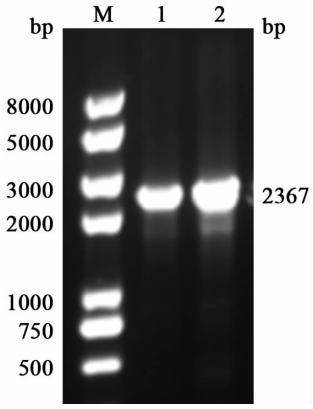
2.7 S1蛋白表达工艺优化 分别采用Sf9细胞与Hi5细胞进行MOI、TOI、TOH优化。MOI优化：细胞以0.8×10^6 cells/mL接种至125 mL摇瓶，工作体积为30 mL，待细胞生长至细胞密度为3.5×10^6 cells/mL时，分别以MOI=0.1、1、2、3接毒，于27 ℃、130 r/nin条件下培养至细胞活率<20%时结束培养，每隔24 h取样计数，并留样用于蛋白样品检测。TOI与TOH优化：细胞以0.8×10^6 cells/mL接种后，分别培养TOI=24、36、48、60、72、84 h，以各自最优MOI接毒，于27 ℃、130 r/min条件下培养至细胞活率<20%时结束培养，每隔24 h取样计数，并留样用于蛋白样品检测。

2.8 S1蛋白的ELISA检测 将SARS-CoV-2 S1抗体使用包被液(无水Na_2CO_3 1.6 g/L，无水$NaHCO_3$ 2.93 g/L)稀释至4 mg/L，以100 μL/孔加至酶标板4 ℃孵育过夜包板，弃去包被液；加入封闭液(PBST中含1% BSA)于37 ℃孵育2 h，弃去封闭液。用稀释液(PBST)将SARS-CoV-2 S1蛋白标准品稀释至600 μg/L(STD1)，再以2/3梯度稀释4个稀释度(STD2-STD5)，从STD5开始用稀释液进行1/2梯度稀释3个稀释度(STD6-STD8)作为标准曲线。样品用稀释液稀释混匀后以100 μL/孔加至酶标板内，37 ℃孵育1 h，洗涤；加入用1∶10 000稀释的HRP偶联抗His标签单抗，100 μL/孔，37 ℃孵育1 h，洗涤；加入显色液TMB，100 μL/孔，室温避光反应10 min；加入1 mol/L H_2SO_4，50 μL/孔，用酶标仪测定各孔A_{450}值。

结 果

1 重组质粒pFastBac-S1的构建及鉴定

重组产物转化大肠埃希菌感受态后进行菌落PCR，经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，扩增片段大小为2 367 bp(图1)，与目的基因片段大小一致。对扩增产物进行测序验证，与初始合成S1蛋白基因序列一致，重组pFastBac-S1供体质粒构建正确。



M DNA标志物(DL8000) 1、2 pFastBac-S1菌落PCR产物

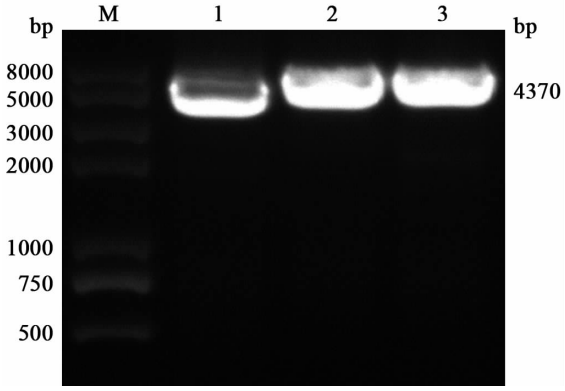
图1 重组pFastBac-S1转化的DH5α菌落PCR鉴定

M DNA marker(DL8000) 1,2 pFastBac-S1 colony PCR product

Fig. 1 PCR identificationof DH5α colony transformed by recombinant pFastBac-S1

2 重组杆粒rbacmid-S1的构建及鉴定

重组pFastBac-S1转化入DH10Bac进行转座，经两次蓝白斑筛选。挑取白斑摇菌，提取rbacmid-S1，使用M13引物进行PCR鉴定，结果如图2。扩增片段大小为4 370 bp，与目的片段大小一致，且测序验证正确，重组杆粒rbacmid-S1构建成功。



M DNA标志物(DL8000) 1～3 rbacmid-S1 PCR产物

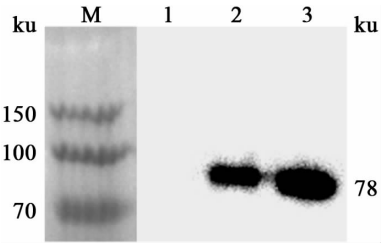
图2 rbacmid-S1的PCR鉴定

M DNA marker(DL8000) 1-3 rbacmid-S1 PCR product

Fig. 2 PCR identification of rbacmid-S1

3 SARS-CoV-2 S1蛋白的表达及鉴定

P3代重组杆状病毒rBV-S1感染Hi5细胞72 h后收获上清，使用anti-His抗体作为一抗，HRP标记羊抗鼠抗体作为二抗进行Western blot，结果显示在78 ku处有特异性反应条带(图3)，表明S1蛋白成功表达，表达蛋白具有反应原性。



M 蛋白分子质量标准 1 空白对照 2、3 rBV-S1感染后Hi5细胞培养上清与相应抗体反应条带

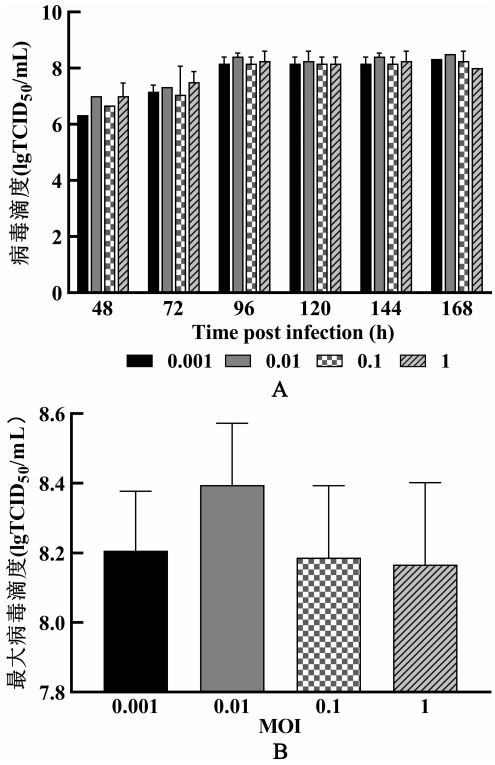
图3 重组S1蛋白的Western blot鉴定

M Protein molecular weight standard 1 Blank control 2,3 Hi5 cells infected with rBV-S1

Fig. 3 Identification of recombinant S1 by Western blotting

4 rBV-S1扩增工艺优化

观察Sf9细胞在不同MOI条件下接毒后病毒滴度变化情，各实验组在96 hpi达到病毒滴度最大值，其后病毒滴度无明显变化(图4 A)，表明96 hpi是较好的TOH。MOI=0.01时，病毒滴度最高，为(8.40±0.16)lgTCID$_{50}$/mL(图4 B)。



A 不同MOI条件下病毒滴度随时间变化情况 B 不同MOI条件下最大病毒滴度

图4 rBV-S1扩增工艺优化

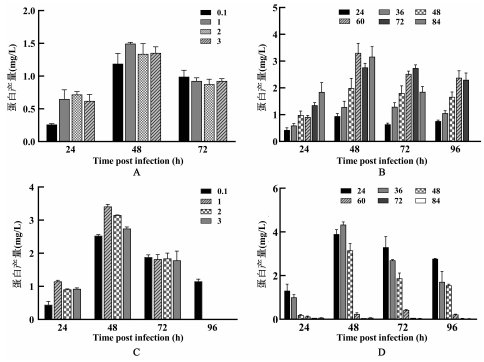
A Baculovirus titers at different post-infection timepoints B Maximum baculovirus titer under different MOI infection conditions

Fig. 4 Optimization of rBV-S1 amplification process

5 S1蛋白表达工艺优化

Sf9细胞在不同MOI条件下接毒后S1蛋白的蛋白产量变化如图5A，48 hpi时MOI=1实验组蛋白产量高于其它组别，为(1.50±0.02)mg/L。选择MOI

=1 进一步对 Sf9 细胞的 TOI 及 TOH 进行优化，结果如图 5B。各实验组蛋白产量均呈现先增长后下降的趋势，在 48 hpi 产量最大，故 48 hpi 为较优的 TOH。48 hpi 时，当 TOI=24-60 h，随 TOI 增大，蛋白产量增高；TOI≥60 h，各实验组间蛋白产量差别不大；TOI=60 h，蛋白产量高于其他实验组，达到(3.31±0.29)mg/L。



A Sf9 细胞中表达 S1 蛋白的 MOI 优化 B Sf9 细胞中表达 S1 蛋白的 TOI 及 TOH 优化 C Hi5 细胞中表达 S1 蛋白的 MOI 优化 D i5 细胞中表达 S1 蛋白的 TOI 及 TOH 优化

图 5 S1 蛋白表达工艺优化

A Optimization of MOI for the S1 expression in Sf9 cells B Optimization of TOI and TOH for the S1 expression in Sf9 cells C Optimization of MOI for the S1 expression in Hi5 cells D Optimization of TOI and TOH for the S1 expression in Hi5 cells

Fig. 5 Optimization of S1 expression process

Hi5 细胞在不同 MOI 条件下接毒后 S1 蛋白的蛋白产量变化如图 5C。48 hpi 时 MOI=1 实验组蛋白产量最高，为(3.41±0.05)mg/L。选择 MOI=1 进一步对 Hi5 细胞的 TOI 及 TOH 优化，结果如图 5D。Hi5 细胞与 Sf9 细胞相同，各实验组蛋白产量均呈现先增长后下降的趋势，48 hpi 为较优的 TOH。48 hpi 时，TOI=36 h 实验组蛋白产量高于其它实验组，最大蛋白产量达到(4.33±0.09)mg/L。

对比 Sf9 细胞与 Hi5 细胞的蛋白表达能力，经过 MOI 与 TOI 优化后，Hi5 细胞为更适合表和用作表达 S1 蛋白的宿主细胞，Hi5 细胞以 0.8×10^6 cells/mL 接种，培养 36 h 后以 MOI=1 接毒，48 hpi 收获，可获得最大蛋白产量。

讨 论

S1 蛋白可与宿主细胞血管紧张素转换酶Ⅱ(ACE-2)结合，参与 SARS-CoV-2 进入宿主细胞[11]，可诱导机体产生中和抗体，被认为是保护性抗原[12]，因此，S1 蛋白的表达是 COVID-19 临床诊断及亚单位疫苗研究的重点。

与基于哺乳动物细胞系的传统系统相比，IC-BEVS 是一种更简单、更安全、更快速且更易于规模化生产重组蛋白的方法，成本更低。近年来，该平台已广泛用于生产病毒结构蛋白，用于开发疫苗以及治疗和诊断分析，以便在发生流行病紧急情况时快速做出反应[13]。目前，对 S1 蛋白的研究主要关注其免疫原性，未对其生产工艺进行研究，而 S1 蛋白生产工艺的开发对应用有其必要性。

本研究将 S1 蛋白基因克隆入 pFastBac™ 1 供体质粒，并通过转座使 S1 蛋白基因插入 bacmid 载体，通过转染 Sf9 获得 rBV-S1，使用 IC-BEVS 在 Hi5 细胞中表达了 SARS-CoV-2 S1 蛋白。在此基础上还进一步优化了在 IC-BEVS 中表达 S1 蛋白的生产工艺。结果显示，对于 MOI=0.001-1 接毒条件，Sf9 细胞在 MOI=0.01 条件下接毒更有利于病毒扩增。对于 MOI=0.1-3 的接毒条件，Sf9 细胞与 Hi5 细胞均在 MOI=1 条件下接毒更有利于蛋白表达。表明低 MOI 感染更有利于病毒扩增过程，而蛋白表达过程则需要相对高的 MOI 感染。对于杆状病毒生产过程而言，针对病毒扩增过程可能产生的缺陷型干扰粒子(defective interfering particles，DIPs)，MOI=0.01 可减少病毒原液的添加量，从而降低 DIPs 与完整病毒共感染同一细胞的概率[14]，减少 DIPs 的累积，获得高质量的病毒。对于蛋白表达过程而言，MOI=1 是非同步感染过程[15]，初次感染发生时未被感染的细胞可继续增殖，使二次感染发生时的可用细胞数增多，从而使蛋白产量提高。经过 TOI 优化后，Sf9 细胞最优 TOI=60 h，Hi5 细胞最优 TOI=36 h，且在两个细胞系中均出现蛋白产量随 TOI 增加显著下降的现象，这可能是由于批培养过程中接毒，不同的 TOI 时的细胞状态、细胞密度、培养环境均有所不同。比较 Sf9 与 Hi5 细胞的蛋白表达能力，两者在蛋白表达方面有显著不同，Hi5 细胞的 S1 蛋白表达能力较强，表明细胞系对最终产量有显著影响。

通过工艺优化，获得最大蛋白产量为(4.33±0.09) mg/L。Expi293F 细胞生产 S1 蛋白周期为 5 d[7]，而本研究中的生产周期为 2 d，节约了时间成本。此外，从经济性考虑，哺乳动物表达系统生产重组蛋白需要使用转染试剂，增加了生产成本。因此，IC-BEVS 是 S1 蛋白大规模生产的良好表达系统。Li 等[16]使用 IC-BEVS 表达了 S1 蛋白，但采用的是传统生产工艺，而未针对 S1 蛋白进行工艺优化，使得 S1 蛋白的生产在次优条件下进行，不利于大规模生产，本研究建立的生产工艺能为 S1 蛋白的高效生产提供科学指导，为 SARS-CoV-2 血清学诊断方法的建立及疫苗开发奠定了基础。

(下转 11 页)

in rats[J]. MoI Neurobiol,2018,55(5):4311-4319.

[8] 吴芳,左涵珺,任雪琪,等. 天麻素对氧糖剥夺诱导的小胶质细胞Notch信号通路的影响[J]. 神经解剖学杂志,2022,38(1):38-44.

[9] 产翠翠,马同军,王继胜,等. 天麻素注射液通过NGF/TrkA通路减轻大鼠脑缺血所致肺损伤[J]. 南方医科大学学报,2022,42(1):116-122.

[10] 熊美燕,李俊玉,唐翔宇,等. 柴胡对呼吸道合胞病毒感染大鼠肺组织病毒载量的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(8):811-815.

[11] Lee ES,Kim KY,Jeong KH,et al. Severe respiratory syncytial virus pneumonia in a kidney transplant recipient with desen sitization:case report and comprehensive review of the literature[J]. Exp Clin Transplant,2020,18(4):515-518.

[12] 于德山,傅生芳,徐丛杉,等. 2018年甘肃省10岁以下儿童流感病毒和呼吸道合胞病毒感染特征[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2020(2):155-159.

[13] Yuan B,Huang H,Qu S,et al. Gastrodin pretreatment protects liver against ischemia-reperfusion injury via activation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Am J Chin Med,2020,48(5):1159-1178 .

[14] 郑海涛,任献青,闫永彬,等. 人呼吸道合胞病毒感染对机体Th1、Th2影响的研究进展[J]. 病毒学报,2020,36(4):719-725.

[15] Gianello V, Salvi V, Parola C, et al. The PDE4 inhibitor CHF6001 modulates pro-inflammatory cytokines, chemokines and T h1- and Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells[J]. Biochem Pharmacol,2019,163(7):371-38.

[16] 乔赟,雷惠婷,易蔚,等. 肺"俞募配穴"艾炷灸对哮喘小鼠Th17/Treg平衡的影响[J]. 中国针灸,2020,40(11):1217-1222.

[17] He S,Sun S,Lu J,et al. The effects of the miR-21/SMAD7/TGF-? pathway on Th17 cell differentiation in COPD[J]. Sci Rep,2021,11(1):6338-6348.

[18] Salwe S,Padwal V,Nagar V,et al. T cell functionality in HIV-1,HIV-2 and dually infected individuals:correlates of disea se progression and immune restoration[J]. Clin Exp Immunol,2019,198(2):233-250.

[19] Li XH,Sun LJ,Chen L,et al. Upregulation of microRNA-219-5p relle ucerative coltis through balancing the difen tiation of treg/th17 cells[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2020,32(7):813-820.

[20] 俞江灏,周金山,蒋晓宁,等. 天麻素通过抑制TLR4/ASK1信号减轻脓毒症小鼠的肺脏炎症[J]. 中成药,2021,43(9):2520-2524.

[21] Tindemans I, Van Schoonhoven A, Kleinjan A, et al. Notch signaling licenses allergic airway inflammation by prom oting Th2 cell lymph node egress[J]. J Clin Invest,2020,130(7):3576-3591.

[22] Zhang Z,Zhou J,Song DQ,et al. Gastrodin protects against LPSinduced acute lung injury by activating Nrf2 signaling pathway[J]. Oncotarget,2017,8(19):32147-32156.

【收稿日期】 2022-09-05 【修回日期】 2022-11-12

(上接5页)

【参考文献】

[1] Kevadiya BD,Machhi J,Herskovitz J,et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections[J]. Nat Mater,2021,20(5):593-605.

[2] Hoffmann M,Kleine-Weber H,Schroeder S,et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. Cell,2020,181(2):271-280.

[3] Castro R,Nobre LS,Eleut rio RP,et al. Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance[J]. Biotechnol Bioeng,2021,118(6):2202-2219.

[4] Yang J,Wang W,Chen Z,et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity[J]. Nature,2020,586(7830):572-577.

[5] Tian Y,Lian C,Chen Y,et al. Sensitivity and specificity of SARS-CoV-2 S1 subunit in COVID-19 serology assays[J]. Cell Discov,2020,6:75.

[6] Wang Y,Wang L,Cao H,et al. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen[J]. J Med Virol,2021,93(2):892-898.

[7] Garc a-Cordero J,Mendoza-Ram rez J,Fern ndez-Benavides D,et al. Recombinant protein expression and purification of N,S1,and RBD of SARS-CoV-2 from mammalian cells and their potential applications[J]. Diagnostics,2021,11(10):1808.

[8] Chu KB,Kang HJ,Yoon KW,et al. Influenza virus-like particle (VLP) vaccines expressing the SARS-CoV-2 S glycoprotein,S1,or S2 domains[J]. Vaccines,2021,9(8):920.

[9] Tripathi NK,Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins:expression hosts and process development[J]. Front Bioeng Biotechnol,2019(7):420.

[10] Drugmand JC,Schneider YJ,Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing[J]. Biotechnol Adv,2012,30(5):1140-1157.

[11] Yang J,Petitjean SJ,Koehler M,et al. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor[J]. Nat Commun,2020,11(1):1-10.

[12] Soraci L,Lattanzio F,Soraci G,et al. COVID-19 vaccines:current and future perspectives[J]. Vaccines (Basel),2022,10(4):608.

[13] Cox MMJ. Innovations in the insect cell expression system for industrial recombinant vaccine antigen production[J]. Vaccines,2021,9(12):1504.

[14] Galibert L,Merten OW. Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases[J]. J Invertebr Pathol,2011(107):S80-S93.

[15] Zitzmann J,Sprick G,Weidner T,et al. New insights into cell culture technology[M]. New York:IntechOpen,2017:43-97.

[16] Struble LR,Smith AL,Lutz WE,et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding[J]. Protein Sci,2022,31(5):e4300.

【收稿日期】 2022-09-10 【修回日期】 2022-11-22