

DOI:10.13350/j.cjpb.220302

• 论著 •

SARS-CoV-2 细菌样颗粒的构建与鉴定^{*}魏世萌^{1,2}, 毕津豪^{1,2}, 李恩涛², 焦翠翠², 闫飞虎², 王振山^{1,2}, 陈祥⁴, 杨松涛², 彭帅^{3**}, 赵永坤^{2**}, 夏咸柱^{1,2**}

(1. 吉林农业大学动物医学院, 吉林长春 130118; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 吉林农业大学食品科学与工程学院; 4. 江苏省人兽共患病重点实验室/江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心)

【摘要】 目的 表达新型冠状病毒(SARS-CoV-2)RBD与乳酸乳球菌锚钩(protein anchor, PA)基因编码的融合蛋白,使其高密度展示在GEM颗粒表面,制备SARS-CoV-2细菌样颗粒并进行鉴定。**方法** 选取SARS-CoV-2武汉分离株刺突蛋白(S)基因序列,利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统构建带有SARS-CoV-2 S蛋白受体结合域(Receptor Binding Domain, RBD)的重组杆状病毒 rBV-RBD-linker-PA3,通过感染昆虫细胞 Sf9 制备融合蛋白 RBD-linker-PA3,使其与GEM(Gram Positive Enhancer Matrix)技术颗粒化的乳酸乳球菌 MG136 结合形成细菌样颗粒(Bacterium-like particles, BLPs) GEM-RLP3。**结果** 成功合成 Linker-PA3(720 bp)和 RBD-linker(687 bp)基因片段,并获得转移粒DNA,基因组PCR鉴定显示重组杆状病毒构建成功,通过细菌样颗粒间接免疫荧光试验可观察到RBD-GEM的颗粒状绿色荧光信号,表明融合蛋白成功展示在GEM颗粒的表面,SDS-PAGE及Western blot结果表明,成功表达可溶性融合蛋白RBD-linker-PA3并被展示在GEM颗粒表面。**结论** 成功制备SARS-CoV-2细菌样颗粒,利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统制备SARS-CoV-2 RBD真核蛋白,配合锚钩蛋白利用柔性Linker将RBD高密度的展示在GEM颗粒表面,为新型疫苗的开发提供了新思路。

【关键词】 新型冠状病毒;细菌样颗粒;细菌表面展示系统;GEM**【中图分类号】** R373.1**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)03-0254-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):254-259, 265.]

Construction and identification of SARS-CoV-2 bacterial-like particles

WEI Shi-meng^{1,2}, BI Jin-hao^{1,2}, LI En-tao², JIAO Cui-cui², YAN Fei-hu², WANG Zhen-shan^{1,2}, CHEN Xiang⁴, YANG Song-tao², PENG Shuai³, ZHAO Yong-kun², XIA Xian-zhu^{1,2} (1. College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University; 4. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis/ Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses) **

【Abstract】 Objective The fusion protein encoded by the gene of Novel Coronavirus RBD and Protein Anchor (PA) of Lactococcus lactis was expressed, which was displayed in high density on the surface of GEM particles. Sars-cov-2 bacteria-like particles were prepared and identified. **Methods** The RBD recombinant baculovirus RBV-RBD-Linker-PA3 with receptor Binding Domain containing SARS-COV-2 S protein was constructed using insect cell-baculovirus expression system, and the fusion protein RBD-Linker-PA3 was prepared by infecting insect cells Sf9. It was combined with Lactococcus lactis MG136 granulated by gram positive enhancer matrix technology to form bacteria-like particles (BLPs) GEM-RLP3.

Results Linker-pa3 (720 bp) and RBD-Linker (687 bp) gene fragments were successfully synthesized and plasmid DNA was obtained. Genomic PCR identification showed that the recombinant baculovirus was successfully constructed. Indirect immunofluorescence and Western Blot results showed that the fusion protein RBD-Linker-PA3 was successfully expressed and soluble. The results of indirect immunofluorescence, SDS-PAGE and Western Blot indicated that the fusion protein was successfully displayed on the surface of GEM particles with good specificity. **Conclusion** Sars-cov-2 bacteria-like particles were successfully prepared, and the SARS-CoV-2 RBD eukaryotic protein was prepared by insect cell-baculovirus expression system. The high density of RBD was displayed on the surface of GEM particles by flexible Linker with anchor protein, which provided a new idea for the development of new vaccine.

【Key words】 SARS-CoV-2; Bacterial-like particles; Bacterial surface display system; GEM^{*} **【基金项目】** 江苏省人兽共患病重点实验室资助项目(R2010)。^{**} **【通讯作者】** 彭帅, E-mail: pengshuaiglx@163.com; 赵永坤, E-mail: zhaoyongkun1976@126.com; 夏咸柱, E-mail: xiaxzh@cae.cn**【作者简介】** 魏世萌(1992-), 男, 吉林省蛟河市人, 硕士, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: weishimeng001@163.com

材料与方法

1 材料

1.1 基因、载体和菌株 SARS-CoV-2 S 基因片段 (GenBank 登录号 NC_045512.2) 和含有锚定蛋白 PA 基因的质粒 pUC57-PA3 (*L. lactis* MG1363) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; pFastBac-1 载体, DH10Bac *E. coli* 感受态细胞, DH5α *E. coli* 感受态细胞, *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) 昆虫细胞和乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* MG1363) 均由军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所动物病毒学与特种经济动物疫病学实验室制备并保存。

1.2 主要试剂和仪器 Xba I、Kpn I 限制性核酸内切酶和 Lipofectamine® 3000 转染试剂购于美国 Thermo Fisher 公司; T4DNA 连接酶和 Phusion 超保真 DNA 聚合酶购于美国 New England Biolabs 公司; 质粒小提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购于美国 Ax-ygen 公司; 低温高速离心机购于日本 HITACHI 公司; 荧光显微镜购于德国 ZEISS 公司; 核酸扩增仪购于杭州朗基科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与目的基因的扩增 通过 Primer 5.0 软件设计引物并交由吉林省库美生物科技有限公司合成。引物序列如表 1。以质粒 pUC57-PA 和 pUC57-S 为模板, 分别以 Linker-PA3-F 和 PA3-R, RBD-F 和 Linker-RBD-R 为上、下游引物合成 Linker-PA3 (708bp) 和 RBD-linker (687bp) 基因片段。回收目的基因片段, 并以此为模板, 利用 Overlap PCR, 以 RBD-F 和 PA3-R 为上、下游引物合成 RBD-linker-PA3 (1404bp) 基因片段。

表 1 引物设计及参考序列
Table 1 primers design and reference sequence

引物名称 Primer	引物序列 Sequence
RBD-F ^{1,2}	5'-TGCTCTAGA <u>CATCACCATCACCATCAC</u> AG AGTCCAACCAACAGAATC-3' (Xba I)
Linker-RBD-R ³	5'- <u>ACCAGAACCACCACAGAACCACC</u> GATTC TGTTGGTTGGACTCT-3'
Linker-PA3-F ³	5'- <u>GGTGGTTCTGGTGGTGGTCTGGT</u> GATGG TGCTTCTTCAGCTGG-3'
PA3-R ¹	5'-CCGCTCGAGTTACTTGATACGCAGGTATTGA CCGATC-3' (Xho I)
Puc-M13-R	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

注: 加粗部分为酶切位点序列; 画线部分为 His-tag 基因序列; 斜体画线部分为 Linker (Gly-Gly-Ser-Gly) × 2 基因序列。

2.2 重组穿梭质粒的构建 将 PCR 扩增的 RBD-linker-PA3 基因片段和 pFastbac-1-HBM 载体分别用 Xba I 和 Xho I 进行双酶切, 回收 RBD-linker-PA3 基因片段和 pFastbac-1-HBM 载体片段, 用 T4

自 2019 年 12 月新冠肺炎 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19) 疫情爆发以来, 全球确诊病例超 2 亿, 死亡人数超 458 万人 (<https://covid19.who.int/>, 截至 2021 年 9 月), 是目前已知流行程度最广泛并尚未结束的全球紧急公共卫生事件。随着经济全球化的不断加深, 各国之间的贸易往来及人口流动也加剧了 COVID-19 传播的风险。在境外输入性病例与各国本土病例并存的情况下, 各种病毒突变株及无症状感染者案例层出不穷, 这为疾病的临床症状观察及病例的确诊带来了极大挑战。

COVID-19 是由 SARS-CoV-2 引起的一种经呼吸道传播的病毒性疾病, 该病主要侵袭肺部、心脏和肾脏等多个主要器官, 主要临床表现为发烧、疲劳、头痛、干咳、气短、寒颤、肌肉疼痛等症状, 在老年人及患有基础性或慢性疾病的人群中病死率较高^[1-3]。疾病潜伏期通常为 2~14 d, 97.5% 的患者在感染后 11 d 出现症状, 无症状感染者也具有传播病毒的能力^[4]。在接触 SARS-CoV-2 10 d 内, 多达 14% 的受感染者出现严重症状, 如咳嗽、发烧和呼吸困难。约 5% 的感染者发展成为重度肺炎的关键阶段, 并开始依赖呼吸器^[5]。

冠状病毒科分为 α、β、γ 和 δ 冠状病毒属, α 和 β 属主要感染哺乳动物, 如蝙蝠、水貂、猫、猪、马等多种动物; 禽类冠状病毒主要为 γ 和 δ 属, 易感染多种禽类^[6]。SARS-CoV-2 属于冠状病毒科 β 冠状病毒属^[7-8], 是一种有包膜、不分节段的单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈椭圆形或圆形, 直径为 80~120 nm。SARS-CoV-2 基因组编码 16 个非结构蛋白 (nsp1-nsp16), 4 种主要结构蛋白 (S、N、M、E) 和若干附属蛋白。其中表面刺突糖蛋白 (Spike glycoprotein, S) 包含的特异性受体结合域 (Receptor Binding Domain, RBD) 是机体产生体液免疫的主要靶点, 因此备受关注。S 蛋白为病毒表面突出的三聚体结构, 包含 S1、S2 两个功能性亚基; S1 亚基包含受体结合域 (RBD), 负责与细胞受体结合; S2 亚基主要介导病毒和宿主细胞膜融合^[9]。冠状病毒进入宿主细胞的过程由其表面的 S 蛋白介导, 对 SARS-CoV S 蛋白及其与细胞受体 ACE2 相互作用的冷冻电镜研究表明, 受体结合诱导 S1 与 ACE2 解离, 促使 S2 从亚稳定的融合前状态逐渐过渡到对膜融合至关重要且更稳定的融合后复合体状态^[10-12], 并强调了 ACE2 在介导 SARS-CoV-2 进入细胞中的重要作用^[13-16]。

本研究利用柔性 Linker 将 SARS-CoV-2 RBD 蛋白与乳酸乳球菌锚钩 PA 蛋白连接, 使 RBD 蛋白高密度展示在经酸处理后颗粒化的乳酸乳球菌细胞壁肽聚糖空心骨架表面, 构建 SARS-CoV-2 BLP, 旨在为 SARS-CoV-2 基因工程亚单位疫苗研发提供新思路。

DNA 连接酶室温连接过夜,连接产物转化至感受态细胞 DH5 α *E. coli*,构建重组转移质粒 pFastbac1-RBD-linker-PA3,涂布氨苄抗性平板培养基 37 °C 培养 12 h,挑取平滑单菌震荡培养后进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定,鉴定正确质粒交由库美生物科技有限公司测序。

2.3 重组杆粒的构建 取测序正确的重组穿梭质粒 pFastbac1-RBD-linker-PA3 转化至感受态细胞 DH10Bac *E. coli*,涂布三抗板(卡那、四环素、庆大霉素)进行蓝白斑筛选,于 37 °C 培养 36~48 h,挑取单个圆滑白斑涂板。挑取验证后的白色菌落接种至液体三抗培养基,37 °C、200 r/min 震荡培养 16 h,提取重组杆粒,以 RBD-F 和 PA3 为上、下游引物进行 PCR 鉴定,鉴定正确的重组杆粒命名为 rBacmid-RBD-linker-PA3。

2.4 重组杆状病毒的拯救和重组杆状病毒的鉴定 利用 Lipofectamine[®] 3000 将重组杆粒 rBacmid-RBD-linker-PA3 转染至 Sf9 细胞。贴壁 Sf9 细胞以 500 μ L/孔体积传至 24 孔细胞培养板,至密度 80%~90% 汇合度时,以 3% 体积比分别接种 P3 代重组杆状病毒 rBV-RBD-linker-PA3 和杆状病毒野毒 BV,于 27 °C 培养 48 h 后通过间接免疫荧光试验进行鉴定。另取贴壁 Sf9 细胞以 2 mL/孔体积加入 6 孔细胞培养板,至密度 80%~90% 汇合度时,以 3% 体积比接种 P3 代重组杆状病毒 rBV-RBD-linker-PA3,于 27 °C 培养 80~90 h 后进行 Western blot 鉴定,

2.5 GEM 颗粒的制备与鉴定 GM17 肉汤培养基中接种乳酸乳球菌,30 °C 震荡培养 12 h。取菌液以 6 000 r/min 离心 15 min,弃上清;用 0.01 mol/L PBS 溶液重悬沉淀,6 000 r/min 离心 15 min 弃上清。重复洗涤一次。用 10% 三氯乙酸溶液充分重悬沉淀,煮沸 30 min,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清;沉淀用 0.01 mol/L PBS 溶液充分重悬混匀,洗涤 3 次,再用 0.01 mol/L PBS 溶液充分振荡混匀,调整颗粒密度,2.5 $\times$ 10⁹ 个/mL GEM 颗粒为 1U,分装后-80 °C 保存备用。将处理前后的乳酸乳球菌颗粒于室温 3 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,做冷冻组织切片,透射电镜观察处理前后的颗粒。

2.6 GEM 颗粒与融合蛋白的结合及鉴定 取制备的 GEM 颗粒 1 U 与悬浮培养的 P4 代 rBV-RBD-linker-PA3 上清液 12 mL,室温振荡 30 min。锚定结合后于 4 °C、4 000 g 离心 10 min,弃上清后用 10 mmol/L PBS 溶液充悬沉淀。重复洗涤 3 次。取 1 U GEM 颗粒用 200 μ L 10 mmol/L PBS 溶液充分重悬混匀,于-80 °C 保存备用。锚定结合物命名为 GEM-RLP3 颗粒。取 GEM-RLP3 颗粒 200 μ L,用 3% BSA 作为封闭液室温封闭 30 min;加入用封闭液 1:600 稀释

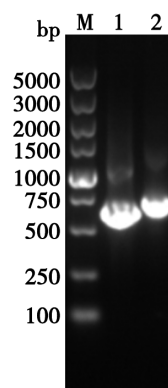
的 SARS-CoV-2 S1 蛋白多克隆抗体,室温孵育 60 min,PBS 溶液洗涤 3 次,3 min/次;加入用封闭液 1:600 稀释的 FITC 标记羊抗兔 IgG,室温避光孵育 60 min;PBS 溶液洗涤 3 次,3 min/次;用去离子水充分重悬沉淀,滴加于载玻片上,于荧光显微镜下观察。

取 GEM-RLP3 颗粒 200 μ L 制备 SDS-PAGE 蛋白样品,电泳后经考马斯亮蓝染色分析 RBD-linker-PA3 与 GEM 颗粒结合活性。取已制备的蛋白样品,电泳后转膜,经 Western blot 鉴定蛋白结合特异性。

结 果

1 目的基因的扩增

以质粒 pUC57-PA 和 pUC57-S 为模板,分别以 Linker-PA3-F 和 PA3-R, RBD-F 和 Linker-RBD-R 为上、下游引物合成 Linker-PA3(720 bp)和 RBD-linker(687 bp)基因片段,结果如图 1。



M DNA 标记物 1 RBD-linker 基因 PCR 产物 2 linker-PA3 基因 PCR 产物

图 1 RBD-linker 和 linker-PA3 基因的 PCR 扩增

M DNA marker 1 RBD-linker gene 2 linker-PA3 gene

Fig. 1 PCR amplification of RBD-linker and linker-PA3 gene

2 重组穿梭质粒的鉴定

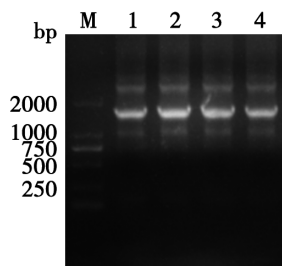
扩增后的基因片段经酶切后胶回收,酶切片段连接至 pFastbac1 载体,连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞。经氨苄抗性涂板、挑菌、摇菌液,用 RBD-F 和 PA3-R 为上、下游引物进行菌液 PCR 鉴定,结果如图 2,目的片段大小与预期相符。

3 重组杆粒的鉴定

3.1 重组杆状病毒 PCR 鉴定 经蓝白斑筛选得到的菌液通过 DNA 提取试剂盒提取重组转移杆粒 DNA,以此为模板,以 RBD-F/Puc-M13-R 为上、下游引物做 PCR 扩增鉴定,结果如图 3, rBpFastbac1-RBD-linker-PA3 重组杆粒扩增片段大小为 3 704 bp,与预期相符。

3.2 重组杆状病毒间接免疫荧光试验鉴定 将重组杆状病毒 rBV-RBD-linker-PA3 和杆状病毒野毒 BV 分别接种于贴壁培养 Sf9 细胞,经 27 °C 培养 48 h 后

进行间接免疫荧光试验。与感染杆状病毒野毒和正常贴壁培养的 Sf9 细胞性比, rBV-RBD-linker-PA3 可看到出现绿色荧光信号, 表明目的蛋白成功表达(图 4)。

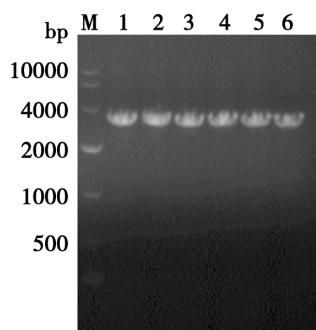


M DNA 标记物 1~4 pFastbac1-RBD-linker-PA3 菌液 PCR 产物

图 2 pFastbac1-RBD-linker-PA3 菌液 PCR 鉴定

M DNA marker 1~4 pFastbac1-RBD-linker-PA3 bacterial culture medium

Fig. 2 PCR amplification of pFastbac1-RBD-linker-PA3 bacteria

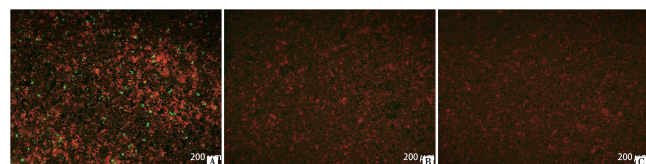


M DNA 标记物 1~6 rBpFastbac1-RBD-linker-PA3 PCR 产物

图 3 重组杆状病毒 rBpFastbac1-RBD-linker-PA3 的 PCR 鉴定

M DNA marker 1~6 PCR amplification product of rBpFastbac1-RBD-linker-PA3

Fig. 3 PCR amplification of recombinant baculovirus plasmid of rBpFastbac1-RBD-linker-PA3



A rBV-RBD-linker-PA3 B BV (WT) C 细胞对照

图 4 重组杆状病毒的间接免疫荧光鉴定

A Infected cells by rBV-RBD-linker-PA3 B Infected cells by BV C Control

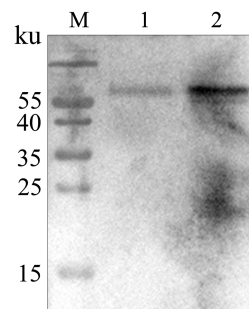
Fig. 4 IFA amplification of the rescued recombinant baculovirus

3.3 重组杆状病毒的 Western blot 鉴定 将重组杆状病毒 rBV-RBD-linker-PA3 的培养上清和细胞沉淀以兔抗 SARS-CoV-2 S1 蛋白多克隆抗体为一抗进行 Western blot 鉴定, 结果如图 5。RBD-linker-PA3 反应条带位于 55-70 ku 之间, 表明目的蛋白可溶性表达并具有良好的免疫反应性。

4 GEM 颗粒处理前后的冷冻切片分析

MG1363 乳酸乳球菌经三氯乙酸热处理后, 与 RBD-linker-PA3 融合蛋白相结合, 并对处理前、后的

乳酸乳球菌和结合后的 GEM 颗粒进行冷冻切片分析, 结果如图 6。乳酸乳球菌处理前颜色较深, 有完整的细胞壁, 胞内内容物较多且质地均一。经处理后, 其自身核酸及蛋白质被破坏, 菌体表面光滑内容物减少, 但仍保持细菌骨架及形态; 结合后的 RBD-linker-PA3-GEM 与 GEM 相比, 表面不再光滑, 胞壁出现粗糙的絮状物层。表明 GEM 颗粒与 RBD-GEM 颗粒均制备成功。



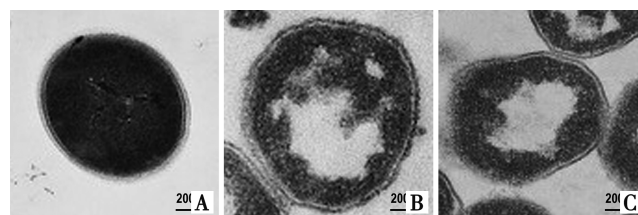
M 蛋白分子质量标准 1 rBV-RBD-linker-PA3 细胞沉淀悬液

2 rBV-RBD-linker-PA3 培养上清

图 5 重组杆状病毒的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1 Cell sedimentation of rBV-RBD-linker-PA3 2 Culture supernatant of rBV-RBD-linker-PA3

Fig. 5 The western blot identification of the rescued recombinant baculovirus



A 未经处理的 MG1363 B GEM 颗粒 C RBD-GEM 颗粒

图 6 乳酸乳球菌电镜观察

A Untreated MG1363 B GEM particles C RBD-GEM particles

Fig. 6 Transmission electron microscope images of *L. lactis* cells

5 细菌样颗粒的制备与鉴定

5.1 细菌样颗粒的间接免疫荧光试验鉴定 为验证表达的融合蛋白与 GEM 颗粒结合情况, 以兔抗 SARS-CoV-2 S1 蛋白多克隆抗体为一抗进行间接免疫荧光试验, 结果如图 7。rBV-RBD-linker-PA3 在荧光显微镜下可观察到 RBD-GEM 的颗粒状绿色荧光信号, 表明融合蛋白成功展示在 GEM 颗粒的表面。

5.2 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 将 RBD-linker-PA3 蛋白和 GEM 颗粒进行锚定结合, 结合后的 GEM 颗粒以单 GEM 颗粒为对照做 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。SDS-PAGE 结果如图 8A 所示, RBD-linker-PA3 蛋白锚定结合后的 GEM 颗粒出现一条特异性条带, 分子质量与 RBD-linker-PA3 蛋白一致。Western blot 如图 8B 所示, 与 GEM 颗粒锚定结

合后的融合蛋白与兔抗 SARS-CoV-2 S1 蛋白多克隆抗体产生特异性反应,反应条带位于 85 ku 处,与 SDS-PAGE 结果一致。

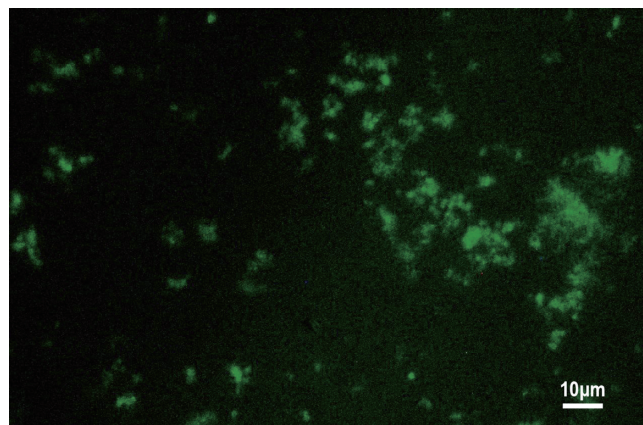
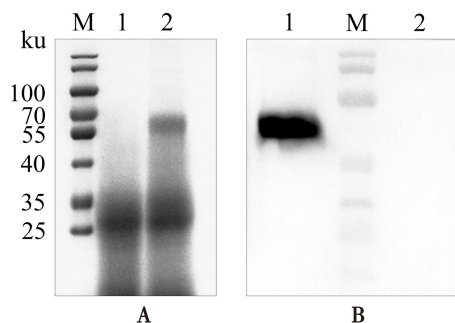


图 7 RBD-GEM 的间接免疫荧光试验鉴定
Fig. 7 IFA identification of RBD-GEM



A M 蛋白质分子质量标准 1 GEM 颗粒对照 2 GEM-RLP3 B M 蛋白质分子质量标准 1 GEM-RLP3 2 GEM 颗粒对照

图 8 GEM-RLP3 的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

A M Protein marker 1 GEM 2 GEM-RLP3 B M Protein marker 1 GEM-RLP3 2 GEM

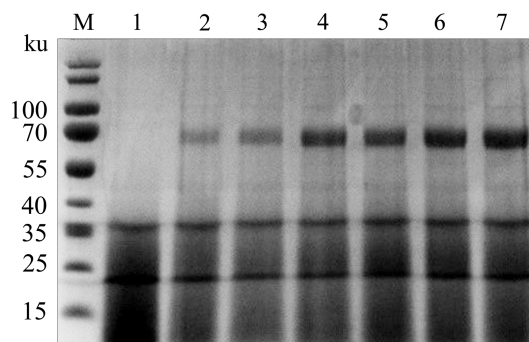
Fig. 8 SDS-PAGE and Western blot identification of GEM-RLP3

5.3 锚定结合量的确定 取 0.5 UGEM 颗粒分别与 0、2、4、6、8、10、12 mL 的病毒培养上清液结合,取等量样品做 SDS-PAGE 分析,经灰度分析计算相对结合量,结果如图 9 和图 10。0.5 UGEM 颗粒随结合体积增加,目的条带颜色逐渐变深,当培养上清液体积为 8 ml 及以上时,结合量趋于饱和。

讨论

自 COVID-19 疫情出现以来,全球确诊人数激增。这场大流行严重阻碍了世界各地更为广泛的社交来往,文化交流及经济发展。国外与日俱增的确诊病例及国内零星出现的输入性病例和本土病例,导致差旅受到限制,严重扰乱了全球经济和公共卫生服务。目前尚无有效的治疗方法来治疗 COVID-19 患者出现的急性呼吸窘迫综合征和不可逆转的肺脏纤维化,因此疫苗是阻止 SARS-CoV-2 传播和控制疫情最

快且最有希望的方法^[17]。



M 蛋白质分子质量标准 1~7 依次为 0、2、4、6、8、10、12 mL 重组杆状病毒培养上清液

图 9 RBD-linker-PA3 融合蛋白与 GEM 颗粒结合情况的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1~7 0、2、4、6、8、10、12 mL recombinant baculovirus culture supernatant

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of binding capacity of RBD-Linker-PA3 fusion protein to GEM particles

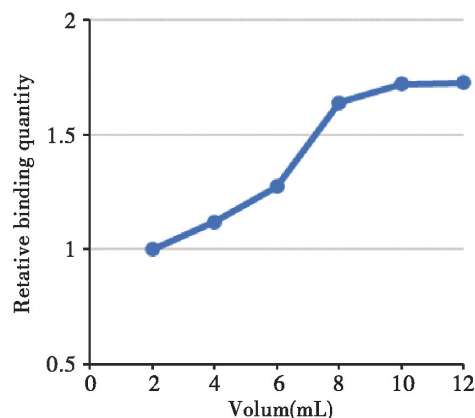


图 10 融合蛋白与 GEM 颗粒的相对结合量曲线

Fig. 10 The relative binding quantity amount curve of fusion protein to GEM particles

疫苗提供对疾病的适应性免疫,是预防医学的一种形式。通常,疫苗是由减毒(活的,但致弱)或灭活(被热或化学物质杀死)的病原体,或病原体的一个或多个抗原亚成分(亚单位疫苗和结合疫苗)制成的^[18]。自 COVID-19 疫情出现以来,全球已有多种疫苗获批上市。由于灭活疫苗的制造工艺已经趋于成熟,因此被快速开发,目前已有多种灭活疫苗被上市批准投入临床^[19]。

与严重急性呼吸综合征病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征病毒(MERS-CoV)一样,SARS-CoV-2 是一种源于人畜共患病的冠状病毒,该病毒在遗传进化过程中产生的适应性突变体,很可能会爆发更多大流行疫情^[20]。目前,被 WHO 推荐值得重点关注的 4 种突变体分别为:B. 1. 1. 7 (Alpha, α), B. 1. 351 (Beta, β), P. 1 (Gamma, γ) 和 B. 1. 617. 2 (Delta, δ) (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS->

CoV-2-variants/)).当前已有多项案例显示,接种针对标准株设计的疫苗无法对突变体提供有效的保护^[21]。为了高效应对正在或即将出现的 SARS-CoV-2 突变体及其他新发传染病,有必要改进和建立能够快速开发有效、安全的疫苗的技术。

现代疫苗设计的目标是最大限度地提高效力,同时将潜在的严重不良反应降至最低,例如引起过敏反应或对机体造成损害的毒性效应。为此,新的方法已经从早期的减毒灭活全病原体疫苗转向纯化抗原(亚单位),因为这些疫苗具有更好的安全性^[12]。

GEM 颗粒表面展示系统作为一种新型抗原蛋白展示系统,具有成本低、易生产、便于储存和运输等优势,在活疫苗运输系统的开发、诊断和新型生物催化剂等领域得到广泛应用。自 2006 年开发应用以来,该系统已被应用在 SARS、MERS、HIV、A 型流感、呼吸道合胞病毒、新城疫等疾病的疫苗研究中^[22-26]。

本研究利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统制备 SARS-CoV-2 RBD 真核蛋白,配合锚钩蛋白利用柔性 Linker 将 RBD 高密度的展示在 GEM 颗粒表面。柔性 Linker 的加入既保障了 RBD 与 PA 蛋白之间的间隔距离,又保留了两种蛋白可相互作用的功能。另外,利用正确表达的 RBD-PA3 融合蛋白可与 GEM 颗粒结合,反之则无法结合的特点,使得 RBD-PA3 融合蛋白免受亲和纯化这一步骤,简化了亚单位疫苗的制备工艺,节约了生产成本。并且,乳酸菌(LAB)作为粘膜疫苗开发的潜在递送系统和/或佐剂的相关研究已发展数年^[27-29]。多项研究表明,利用 GEM 表面展示技术制备的 BLPs 是诱导黏膜免疫反应的极佳载体,已被应用于针对许多不同病原的疫苗设计中^[30],因此本研究构建的 BLP 有望成为开发 SARS-CoV-2 黏膜免疫疫苗的潜力候选,成功制备的 SARS-CoV-2 BLP 为开发具有良好免疫原性且无安全隐患的 SARS-CoV-2 候选疫苗提供了新思路,为预防 SARS-CoV-2 的感染提供了技术支撑。

【参考文献】

[1] Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(5): 475-481.

[2] Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application [J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(9): 577-582.

[3] O'hara LM, Schrank GM, Frisch M, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) symptoms, patient contacts, polymerase chain reaction (PCR) positivity and seropositivity among healthcare personnel in a Maryland healthcare system [J]. *Infect Control*

Hosp Epidemiol, 2021; 1-3.

- [4] Huang NE, Qiao F. A data driven time-dependent transmission rate for tracking an epidemic: a case study of 2019-nCoV [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2020, 65(6): 425-427.
- [5] Diamond MS, Pierson TC. The challenges of vaccine development against a new virus during a pandemic [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(5): 699-703.
- [6] Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [7] Coronaviridae study group of the international committee on taxonomy of V. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4): 536-544.
- [8] Liu C, Mendonca L, Yang Y, et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET [J]. *Structure*, 2020, 28(11): 1218-1224.
- [9] Gui M, Song W, Zhou H, et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding [J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 119-129.
- [10] Song W, Gui M, Wang X, et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2 [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(8): e1007236.
- [11] Kirchdoerfer RN, Wang N, Pallesen J, et al. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15701.
- [12] Yuan Y, Cao D, Zhang Y, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains [J]. *Nat Commun*, 2017(8): 15092.
- [13] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [14] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1735.
- [15] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B beta-coronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4): 562-569.
- [16] 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.
- [17] Hwang WC, Lei W, Katritsis NM, et al. Current and prospective computational approaches and challenges for developing COVID-19 vaccines [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2021(172): 249-274.
- [18] Micoli F, Del Bino L, Alfani R, et al. Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2019, 18(9): 881-895.
- [19] Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Med*, 2021, 27(7): 1205-1211.

- vaccines against *Toxoplasma gondii*: an update [J]. Exp Rev Vacc, 2015, 14(12):1609-1621.
- [4] Cerutti A, Blanchard N, Besteiro S. The bradyzoite: a key developmental stage for the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis [J]. Pathogens, 2020, 9(3):234.
- [5] Masoud F, Leila Z, Fatemeh G. Recent progress in microneme-based vaccines development against *Toxoplasma gondii* [J]. Clin Experl Vacc Res, 2018, 7(2):93.
- [6] 黄荣, 张学勇, 朵红, 等. 多房棘球绦虫钙网蛋白结构和功能的生物信息学研究[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2019, 37(3):16-22.
- [7] Kelley L A, Mezulis S, Yates C M, et al. The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. 2015, 37(3):16-22.
- [8] 刘辉. 弓形虫表面抗原糖蛋白相关序列 SRS47D 生物学特性的初步研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [9] Ghaffari AD, Dalimi A, Ghaffarifar F, et al. Immunoinformatic analysis of immunogenic B- and T-cell epitopes of MIC4 protein to designing a vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* through an in-silico approach [J]. Clin Exper Vacc Res, 2021, 10(1):59.
- [10] 吕燕波, 万瑛, 吴玉章. SARS 病毒基因组所编码的 E 蛋白的二级结构和 B 细胞表位预测 [J]. 免疫学杂志, 2003, 19(6):407-410.
- [11] Foroutan M, Ghaffari A D, Soltani S, et al. Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase 4 (CDPK4) as *Toxoplasma gondii* vaccine target [J]. BMC Res Note, 2021, 14(50):438-443, 465.
- [12] 白杨, 郭旭霞, 纪爱芳, 等. 刚地弓形虫动力蛋白轻链 8a 的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(4):438-443, 465.
- [13] 张学勇, 简莹娜, 马利青. 三种隐孢子虫钙依赖蛋白激酶的生物信息学分析[J]. 生物信息学, 2016, 14(2):78-83.
- [14] 范彦雷, 李立, 娄忠子, 等. 多房棘球绦虫 EM95 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(4):423-428.
- [15] 赵利美, 诸欣平. 寄生虫钙网蛋白及其在虫体与宿主相互作用中的功能[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6):3.
- [16] Ma L, Li D, Yuan C, et al. SjCRT, a recombinant *Schistosoma japonicum* calreticulin, induces maturation of dendritic cells and a Th1-polarized immune response in mice [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):570.
- [17] Ram rez-Toloz G, Sosoniuk-Roche E, Valck C, et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: Immune evasion, infectivity, and tumorigenesis [J]. Trends Parasitol, 2020, 36(4):368-381.

【收稿日期】 2021-10-13 【修回日期】 2022-01-06

(上接 259 页)

- [20] Li R, Liu J, Zhang H. The challenge of emerging SARS-CoV-2 mutants to vaccine development [J]. J Genet Genomics, 2021, 48(2):102-106.
- [21] Tavilani A, Abbasi E, Kian ARA F, et al. COVID-19 vaccines: Current evidence and considerations [J]. Metabol Open, 2021(12):100124.
- [22] Yang R, Zhang SB, Yu Y, et al. Adjuvant effects of bacterium-like particles in the intranasal vaccination of chickens against Newcastle disease [J]. Vet Microbiol, 2021(259):109144.
- [23] Bi JP, Li FS, Zhang M, et al. An HIV-1 vaccine based on bacterium-like particles elicits Env-specific mucosal immune responses [J]. Immunol Lett, 2020(222):29-39.
- [24] Li ET, Chi H, Huang P, et al. A Novel Bacterium-like particle vaccine displaying the MERS-CoV receptor-binding domain induces specific mucosal and systemic immune responses in mice [J]. Viruses, 2019, 11(9):799.
- [25] Keijzer C, Haijema BJ, Meijerhof T, et al. Inactivated influenza vaccine adjuvanted with Bacterium-like particles induce systemic and mucosal influenza A virus specific T-cell and B-cell responses after nasal administration in a TLR2 dependent fashion [J]. Vaccine, 2014, 32(24):2904-2910.
- [26] Rigter A, Widjaja I, Versantvoort H, et al. A Protective and safe intranasal RSV vaccine based on a recombinant prefusion-like form of the F protein bound to bacterium-like particles [J]. PloS One, 2013, 8(8):e71072.
- [27] Oh SH, Kim SH, Jeon JH, et al. Cytoplasmic expression of a model antigen with M Cell-Targeting moiety in lactic acid bacteria and implication of the mechanism as a mucosal vaccine via oral route [J]. Vaccine, 2021, 39(30):4072-4081.
- [28] Takahashi K, Orito N, Tokunoh N, et al. Current issues regarding the application of recombinant lactic acid bacteria to mucosal vaccine carriers [J]. Appl Microbiol Biot, 2019, 103(15):5947-5955.
- [29] Mojangani N, Shahali Y, Dadar M. Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development [J]. Benef Microbes, 2020, 11(3):213-226.
- [30] Tonetti FR, Arce L, Salva S, et al. Immunomodulatory properties of bacterium-like particles obtained from immunobiotic lactobacilli: prospects for their use as mucosal adjuvants [J]. Front Immunol, 2020(11):15.

【收稿日期】 2021-11-24 【修回日期】 2022-02-15