

· 论 著 ·

# 基于毕赤酵母制备的 SARS-CoV-2 RBD 重组蛋白疫苗的免疫方案优化及不同佐剂对中和抗体滴度的影响<sup>\*</sup>

王 恒<sup>1</sup>, 蒋苳芳<sup>1</sup>, 刘 柯<sup>1</sup>, 马庆庆<sup>2△</sup>

遵义医科大学附属航天医院: 1. 检验科; 2. 中心实验室, 贵州遵义 563000

**摘 要:**目的 对基于毕赤酵母制备的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)RBD 重组蛋白疫苗的免疫方案进行优化并考察不同佐剂对中和抗体(NAb)滴度的影响,为 SARS-CoV-2 疫苗的持续优化研究提供参考。**方法** 将 RBD 基因片段亚克隆至 pPICZαA 质粒,质粒经线性转化后整合到毕赤酵母基因组中进行重组表达,将获得的重组蛋白疫苗联合不同的佐剂对小鼠进行免疫以评估其免疫原性。**结果** 目标蛋白 wtRBD 和 Delta RBD 均能通过毕赤酵母系统获得满意过表达;与 42 d 间隔时间相比,28 d 间隔时间的 IgG 抗体滴度增加了 1.8 倍(44 923 *vs.* 80 507);间隔 28 d 的 3 剂免疫后,针对 Delta 变体的 NAb 几何平均滴度比间隔 42 d 高 2.5 倍(2 191 *vs.* 891);Delta RBD 重组蛋白疫苗联合铝佐剂免疫后,针对 Delta 变体的 NAb 几何平均滴度达到了 32 255(2 167~88 084);在采用 5 μg 或 30 μg Delta RBD 免疫情况下,铝佐剂+CpG 佐剂组的 NAb 滴度均为单独采用铝佐剂组的 10 倍左右;第 3 次免疫后,5 μg 抗原组与 30 μg 抗原组中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 基于毕赤酵母制备的 wtRBD 或 Delta RBD 都可以用作有效的抗原,间隔 28 d 的 3 剂疫苗给药最有效,Delta RBD 重组蛋白与铝佐剂+CpG 佐剂的联合免疫能够获得更高滴度的 NAb 以对 SARS-CoV-2 及其变体发挥免疫作用,可为 SARS-CoV-2 疫苗的持续优化研究提供一定参考。

**关键词:**新型冠状病毒; 受体结合域; 毕赤酵母; 重组蛋白疫苗; 佐剂

**DOI:**10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2024. 01. 014 **中图法分类号:**R392

**文章编号:**1673-4130(2024)01-0069-10 **文献标志码:**A

## Optimization of immune scheme for SARS-CoV-2 RBD recombinant protein vaccine based on *P. pastoris* and the effect of different adjuvants on neutralizing antibody titer<sup>\*</sup>

WANG Heng<sup>1</sup>, JIANG Jinfang<sup>1</sup>, LIU Ke<sup>1</sup>, MA Qingqing<sup>2△</sup>

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Central Laboratory, Affiliated Aerospace Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

**Abstract: Objective** To optimize the immune scheme of SARS-CoV-2 RBD recombinant protein vaccine based on *P. pastoris*, and investigate the effect of different adjuvants on neutralizing antibody (NAb) titer, in order to provide reference for the continuous optimization research of SARS-CoV-2 vaccine. **Methods** The RBD protein was selected and the corresponding gene fragment was synthesized, which was constructed into the pPICZαA plasmid, and the plasmid was integrated into the genome of *P. pastoris* after linear transformation for recombinant expression. The obtained recombinant protein vaccine was combined with different adjuvants to immunize mice to evaluate its immunogenicity. **Results** Both the target proteins wtRBD and Delta RBD were able to achieve satisfactory overexpression through the *P. pastoris* system. Compared with the 42 d interval, the IgG antibody titer at the 28 d interval increased by 1.8 times (44 923 *vs.* 80 507). After 3 doses of immunization at an interval of 28 d, the geometric mean titer of NAb for Delta variant was 2.5 times higher than that at an interval of 42 days (2 191 *vs.* 891). After immunization with Delta RBD recombinant protein vaccine combined with aluminum adjuvant, the NAb geometric mean titer for Delta variants reached 32 255 (2 167~88 084). When using 5 μg or 30 μg Delta RBD immunization, the NAb titers of the aluminum adjuvant+CpG adjuvant group were about 10 times higher than those of the aluminum adjuvant group alone. Af-

<sup>\*</sup> 基金项目:贵州省自然科学基金项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 300)。  
作者简介:王恒,男,副主任技师,主要从事临床检验及免疫方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: maqingqing008@163. com。

ter the third immunization, there was no significant difference in Delta RBD specific IgG titers between the 5  $\mu$ g antigen group and the 30  $\mu$ g antigen group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Both wtRBD and Delta RBD prepared based on *P. pastoris* could be used as effective antigens, with three doses of vaccine administered at a 28 day interval being the most effective. The combined immunization of Delta RBD recombinant protein with aluminum adjuvant + CpG adjuvant could obtain higher titers of NAb to exert immune effects on SARS-CoV-2 and its variants, providing some reference for the continuous optimization research of SARS-CoV-2 vaccines.

**Key words:** SARS-CoV-2; receptor binding domain; *P. pastoris*; recombinant protein vaccine; adjuvant

目前,新型冠状病毒感染(COVID-19)的流行趋势已被有效遏制,但新型冠状病毒(SARS-CoV-2)作为一种具有高变异性的病毒,其对人类的健康仍可能存在威胁,在保持必要警惕的同时,仍需不断优化相关免疫措施。接种重组蛋白疫苗仍是最经济高效的防控措施。SARS-CoV-2 能够编码 4 种结构蛋白:刺突(S)蛋白、包膜(E)蛋白、膜(M)蛋白和核衣壳(N)蛋白<sup>[1]</sup>。其中 S 蛋白上的受体结合域(RBD)被认为能诱导强烈的保护性抗病毒免疫应答,可作为研究病毒抑制剂和疫苗的主要抗原靶标<sup>[2]</sup>。目前,重组蛋白疫苗的生产可通过多种表达系统实现,相对而言,毕赤酵母系统对于 COVID-19 疫苗的开发相对更具优势<sup>[3]</sup>。另有研究表明,重组蛋白在没有佐剂的情况下其所能诱导的免疫反应较弱<sup>[4-5]</sup>。故将重组 RBD 蛋白用作 COVID-19 候选疫苗时应选择合适的佐剂以克服其弱免疫反应的不足。铝佐剂作为一种标准佐剂,已用于批准的 SARS-CoV-2 疫苗,如 EpiVacCorona 和 ZF2001<sup>[6-7]</sup>。然而单纯的铝佐剂在诱导 Th1 型细胞免疫方面仍存在不足<sup>[8]</sup>。CpG 佐剂作为一类 TLR9 激动剂,除激活体液免疫之外,还能有效增强细胞免疫应答<sup>[9]</sup>。将铝佐剂 + CpG 佐剂应用于 RBD 抗原蛋白制剂体系,或许能更充分激发体液免疫和细胞免疫应答<sup>[10]</sup>。本研究以结构生物学设计为指导设计 RBD 抗原蛋白,利用毕赤酵母系统进行重组分泌表达,优化生产工艺,并结合铝佐剂和 CpG 佐剂进行免疫原性研究,旨在为 SARS-CoV-2 疫苗的持续优化研究提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒构建** 参考 GenBank 数据库 SARS-CoV-2 冠状病毒的全长基因序列 (Accession Number: MN908947), 得到病毒的 RBD 序列, 针对毕赤酵母系统进行密码子优化。在 RBD 的 N 末端插入  $\alpha$  因子信号肽以提高蛋白翻译效率, 在 C 末端插入肠激酶(EK)可切割的 6 $\times$ His 标签进行纯化, 重组质粒命名为 wtRBD-co, 合成序列见表 1。将 RBD 片段亚克隆至 pPICZ A 表达载体中以构建 pPICZ $\alpha$  A-wtRBD-co

质粒。对 SARS-CoV-2 RBD 序列进行密码子优化, 重组质粒命名为 wtRBD-co1, 合成序列见表 1。合成的基因插于 pUC57 质粒载体, 以该质粒为模板, 使用引物对 3/4 对 wtRBD-co1 进行 PCR 扩增; 以 pPICZ $\alpha$  A 为模板, 使用引物对 1/2 获取  $\alpha$ -因子片段。使用引物对 1/4 采用重叠延伸 PCR 技术将以上两个 PCR 产物片段连接, 并通过 EcoR I / Sal I 双酶切克隆到载体 pPICZ A 中, 所得质粒命名为 pPICZ $\alpha$  A-wtRBD-co1。接着, 以 pPICZ $\alpha$  A-wtRBD-co1 为模板, 使用引物对 1/5 和 4/6 对 Delta SARS-Cov-2 RBD 进行 L452R 和 T478K 位点特异性诱变, 使用引物对 1/4 采用重叠延伸 PCR 技术将以上两个 PCR 片段连接, 并通过 EcoR I / Sal I 双酶切克隆到载体 pPICZ A 中, 所得质粒命名为 pPICZ $\alpha$  A-Delta RBD-co。本研究使用的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体引物序列见表 1。

**1.2 重组毕赤酵母的克隆** 重组质粒 pPICZ $\alpha$  A-wtRBD-co 和 pPICZ $\alpha$  A-Delta RBD-co 经 Sac I 线性化后, 通过电穿孔法转化至毕赤酵母 X33 (GenePulser Xcell 电穿孔仪, Bio-Rad), 并铺板在含 100  $\mu$ g/mL zeocin 的 YPDS 琼脂平板上, 在 30  $^{\circ}$ C 下选择与 wtRBD-co 或 Delta RBD-co 基因整合的酵母克隆, 再利用引物 5' AOX 和 3' AOX (表 2) 进行菌落 PCR 鉴定, 选择阳性克隆并将重组菌株接种于 3 mL BMGY 培养基中, 30  $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养, 直至吸光度 ( $A_{600}$ ) 达到 2.0~6.0。接着取菌液于 4  $^{\circ}$ C 下以 3 000 r/min 离心 5 min 收获酵母细胞, 将收集的菌体重悬于等体积的含 0.5% (V/V) 甲醇的 BMMY 培养基中, 于 30  $^{\circ}$ C 下 250 r/min 振荡诱导 72 h, 每隔 24 h 向培养基中补加 0.5% (V/V) 的甲醇。通过蛋白质印迹分析定量单个酵母克隆上清液中 RBD 蛋白的表达水平。

**1.3 RBD 蛋白的表达与纯化** 如前所述, 将选定的酵母克隆在 300 mL BMGY 培养基中培养, 并在诱导后约 72 h 后, 以 15 000 r/min 在 4  $^{\circ}$ C 下离心 15 min 收获上清液。将含有 wtRBD 或 Delta RBD 的上清液

用 0.22 μm 过滤器过滤后,用 HisTrap HP 5 mL 色谱柱(美国 GE 公司)进行纯化,然后采用 HitrapQ 阴离子交换柱(HiTrap Q HP,美国 GE 公司)和尺寸排阻柱(Superdex 200 increase 10/300 GL,美国 GE 公司)做进一步纯化。将纯化后的蛋白用肠激酶[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]在 4℃下消化过夜以切割 6×His 标签。在含有 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)和 150 mmol/L NaCl 的缓冲液中,通过 HiTrap Q HP 色谱柱和 Superdex 200 increase 10/300 GL 色谱柱去除肠激酶和标签。在含有 1%溴酚蓝、10%十二烷基硫酸钠(SDS)、50%甘油和 60 mmol/L Tris-

HCl(pH6.8)的上样缓冲液中于 95℃孵育 10 min 使样品变性,然后用 10%十二烷基硫酸液-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。用考马斯蓝 R-250 染色,进行胶扫描纯度分析或者将蛋白转至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)进行蛋白质印迹分析,先于室温下用含有 5%脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭 2 h,然后将膜与一抗 SARS-CoV-2 RBD(1:2 000,北京义翘神州科技股份有限公司, Cat # 40592-T62)于 4℃孵育过夜,最后采用二抗抗兔 IgG(1:4 000,亚科因生物技术有限公司)在室温下孵育 1 h。使用化学发光检测试剂盒(ECL)进行光信号检测。

表 1 SARS-CoV-2 RBD 的密码子优化序列

基因名称	序列(5′-3′)
wtRBD-co	ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGACGATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACAC TACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAAATACTACTATTG CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAGAGTTCAGCCA ACTGAGTCCATCGTCAGATTCCCAAACATCACCAACTTGTGCCATTTCGGTGAGGTTTTCAACGCTACT AGATTGCGTTCCGTTTACGCCTGGAACAGAAAGAGAATCTCCAAC TCGGTTGCTGACTACTCCGTCTTG TACAAC TCTGCTTCATTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGTGTTTCCCAACTAAGTTGAACGACCTGTGTT TCACTAACGTCTACGCCGACTCCTTCGTTATTAGAGGTGACGAGGTTAGACAGATCGCTCCAGGTCAA ACTGGTAAGATCGCTGACTACAAC TACAAGCTGCCAGACGACTTCACCGGTTGTGTTATTGCTTGGA CTCCAACAACCTGGACTCCAAGGTTGGTGGTAACTACAATTACCGGTACCGTCTGTT CAGAAAGTCCA ACCTGAAGCCATTCGAGAGAGACATCTCACCGAAATCTACCAAGCTGGTTCCAAGCCATGTAACGG TGTTGAGGGTTTCAACTGTTACTTCCCATTGCAGTCCTACGGTTTCCAGCCAACTAATGGTGTTGGTTAC CAGCCATACAGAGTCGTCGTTTTGTCC TCGAGTTGTTGCATGCTCCAGCTACTGTTTGCGGTCCAAAG AAGTCCACTAACCTGGTCAAGAACAAGTGCGTCAACTTTGATGATGACGACAAGGGTGGTGGTGTTCC CCATCATCATCATCATCATTGA
	ATGAGAGTCCAACCGACTGAGTCCATCGTTTCGATTTCCCAACATCACTAACCTGTGTCCTTTTCGGGGAG GTATTTAATGCGACGCGGTTTCGTTTCAGTGTACGCTTGGAATAGGAAACGTATCTCTAATTGTGTCGCAG ATTACTCAGTTTCTTTACAACAGTGCCAGTTTTTCAACGTTTAAGTGTTATGGCGTGAGCCCGACAAAGCTG AACGATCTATGTTTTACTAACGTATATGCAGACAGCTTCGTTATACGTGGGGATGAAGTCCGCCAAATTGC CCCTGGGCAAACCGGAAAAAATTGCCGACTATAACTATAAGTTGCCGACGATTTTACCGGCTGCGTGATA GCATGGAAC TCGAACAATTTAGACAGCAAGGTAGGCGGAAATTACAATTACCTATATCGACTTTTCCGGAA GTCAATCTCAAACCATTGTAACGCGACATAAGTACGAGATTTACCAGGCGGGGTCCACACCATGCAAC GGAGTTGAAGGCTTCAATTGTTATTTCCCTCTGCAGTCTTACGGTTTTTCAGCCACTAATGGAGTAGGTTA TCAACCCTACAGGTTGGTTGTGTTATCGTTTGAATTGCTCCACGCTCCCGACAGTATGCGGTCCAAA AAAGTCCACCAACCTAGTCAAAAAACAAATGCGTCAATTTTCGATGATGACGACAAGGGTGGTGGTGTTCC CCATCATCATCATCATCATTA

注:蓝色为 α 因子,粉色为 RBD,棕色为 EK,绿色为连接子,紫色为 6×His。

表 2 用于构建质粒的引物序列

编号	引物名称	引物序列(5′-3′)
1	afactor-F1-EcoR I	ACCGAATTCATGAGATTTCTTCAATTTTTAC
2	afactor-R1-EcoR I	AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAG
3	RBDco1-F2	TCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAGAGTCCAACCGACTGAGTCCATC
4	RBD-Sal I -R	ATTGTGCACTTAATGATGATGATGATGATGGGAACCAACCACCACC

续表 2 用于构建质粒的引物序列

编号	引物名称	引物序列(5′-3′)
5	Delta RBD-F1	TGTCGCGTTCAAATGGTTTGAGATTTCGACTTCCGGAAGTCGATATCGGTAATTGTAA
6	Delta RBD-F2	AACCATTTTGAACGCGACATAAGTACGGAGATTTACCAGGCGGGGTCCAAACCATGCAAC
7	5′ AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
8	3′ AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC

**1.4 wtRBD 糖基化位点分析** 使用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS,赛默飞 Q Exactive Plus LCMS 系统)进行 wtRBD 的糖基化位点分析。将纯化的 wtRBD 蛋白在-20℃下用四体积的预冷丙酮沉淀过夜。收集蛋白质沉淀,20 000×g 离心 10 min。将蛋白质沉淀物重新溶解于变性缓冲液(8 mol/L 尿素,50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>),并在 55℃下用 20 mmol/L DL-二硫苏糖醇(DTT,美国西格玛公司)还原 1 h,在室温并避光条件下用 55 mmol/L 碘乙酰胺(IAA,美国西格玛公司)烷基化 30 min,然后在 37℃下用胰蛋白酶(1:50 w/w)消化过夜。消化后根据制造商的说明用 ZipTipC18 微量层析柱(美国 Millipore 公司)脱盐,最后使用 EASY-nanoLC1200 系统(德国赛默飞公司)偶联 Q Exactive HF-X(德国赛默飞公司)超分辨率质谱仪平台进行质谱分析。原始 MS 文件使用带有 SEQUEST 的 Proteome Discoverer 蛋白质组学软件 2.3 做进一步处理。

**1.5 重组 RBD 蛋白的动物免疫原性试验** 选择 6~8 周龄(19~21 g),健康雌性 BALB/c 小鼠,随机分组后,对小鼠进行肌肉注射铝佐剂或混合佐剂(45 μg 铝佐剂+10 μg CpG)和免疫蛋白(wtRBD 或 Delta RBD),总体积为 100 μL。然后根据既定免疫方案再进行两次加强免疫。在每次免疫后的第 14 天和第 28 天对小鼠进行眼眶采血 200 μL,将血液样品在室温下放置 2 h,然后在 4℃下以 4 000 r/min 离心 30 min 收集血清。将血清样品储存在-80℃条件下待检。

**1.6 检测小鼠 RBD 特异性抗体滴度** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清样品中的 RBD 特异性抗体。ELISA 板(美国康宁公司)每孔预包被 200 ng 抗原,包括 wtRBD、Beta RBD、Delta RBD。将这些抗原在包被缓冲液(35 mmol/L 碳酸氢钠和 15 mmol/L 碳酸钠,pH 9.6)中稀释并于 4℃下孵育过夜。用 PBST 缓冲液(含有 0.05%吐温-20 的 PBS 缓冲液)进行洗板,每孔 300 μL,洗 3 遍,每孔加入 300 μL 封闭液(2%脱脂奶粉)进行封闭,放置于 37℃恒温培养箱中静置 1.5 h,使用洗脱液(PBST 缓冲液)进行洗板,每孔 300 μL,洗 5 遍,弃掉 PBST 缓冲液,将带有 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体用 5%的脱脂奶粉按

1:5 000 稀释,以每孔 100 μL 加入酶联板中,37℃温箱孵育 1.5 h,最后,每孔加入 100 μL 显色剂 TMB,避光静置 20 min 后,每孔加入 100 μL 终止液(2N HCl)。使用酶标仪在 450 nm 处测量 A 值,并在 630 nm 处进行背景校正。根据 LI 等<sup>[11]</sup> 先前描述的方法计算血清抗体滴度。

**1.7 假病毒中和实验** 重组水疱性口炎病毒(VSV)的野生型和变异型 SARS-CoV-2 假病毒购自中国食品药品检定研究院。中和试验于 P3 环境下开展完成。检测时,将培养基稀释的不同稀释度血清与等体积的稀释至 100 TCID<sub>50</sub>/0.05 mL 的假病毒一同在 96 孔板中于 37℃孵育中和 1 h 后,将混合液加入培养有 Vero E6 细胞的 96 孔板内进行侵染,在 37℃下用 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h,在显微镜下观察并记录各孔的细胞病变效应,并通过 Reed-Muench 法则计算血清抑制 50%细胞病变效应时的抗体中和滴度。具体操作参考文献[12]。

**1.8 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

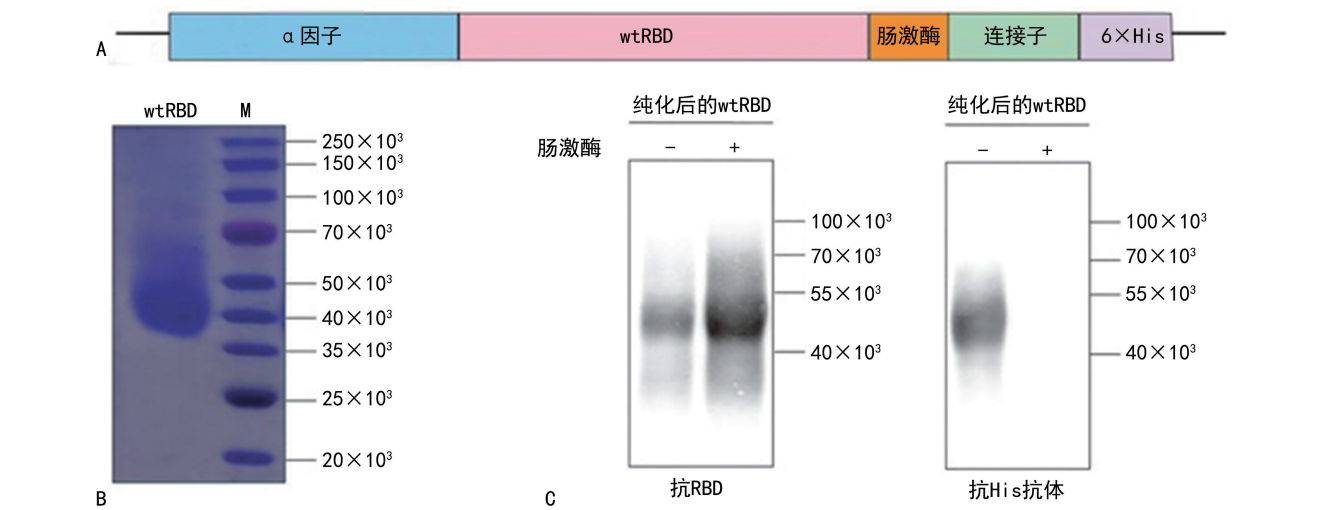
**2.1 重组 wtRBD 蛋白的表达与验证** 毕赤酵母中表达的重组 wtRBD 蛋白的表达载体示意图见图 1A。纯化后,经 SDS-PAGE 电泳并通过考马斯亮蓝染色,结果显示,表达的重组 wtRBD 蛋白相对分子质量为 45×10<sup>3</sup>,见图 1B,同时通过应用抗 RBD(SARS-CoV-2)和抗 His 抗体进行的蛋白质印迹分析获得进一步证实,见图 1C,另外,EK 消化后未检测到 His 标签,表明几乎所有蛋白质标签均能有效被去除,所测得相对分子质量明显高于预估值(26×10<sup>3</sup>),表明纯化的 wtRBD 高度糖基化,使用液相质谱-质谱联用技术(LC-MS)分析糖基化位点,蛋白质组学软件所鉴定的 O-糖基化位点和 N-糖基化位点见表 3。

**2.2 毕赤酵母表达的 wtRBD 引发的针对 SARS-CoV-2 的免疫应答** 为评估毕赤酵母表达的 wtRBD 作为疫苗的免疫效能,设计免疫方案 1 见图 2A,将小鼠随机分为 3 组,各组分别接种 0、30、60 μg wtRBD



进行免疫,同时联合应用 45  $\mu\text{g}$  铝佐剂,共进行 3 次免疫,间隔时间为 28 d,每次免疫后第 14 天采集血清样本用以检测 wtRBD 特异性 IgG 抗体和中和抗体(NAb),结果显示,在接种了 30、60  $\mu\text{g}$  wtRBD 的小鼠中均诱导了明显的免疫应答,见图 2B,且在第 2、3 次免疫接种后,检测到 wtRBD 特异性 IgG 抗体和 NAb 均明显增加,见图 2B、C,但接种 30、60  $\mu\text{g}$  wtRBD 的两组小鼠所检测到的抗体水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

研究还设计了另一个免疫方案来评估毕赤酵母表达的 wtRBD 作为疫苗的免疫效能,免疫方案 2 见图 3A,3 组小鼠 wtRBD 的接种剂量分别为 0、30、100  $\mu\text{g}$ ,接种间隔时间为 42 d,其他处理方法同方案 1,结果与方案 1 一致,第 2、3 次免疫接种后,检测到 wtRBD 特异性 IgG 和 NAb 均明显增加,见图 3B、C,但接种 30、100  $\mu\text{g}$  wtRBD 的两组小鼠所检测到的抗体水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



注:A 为毕赤酵母中表达的重组 wtRBD 蛋白的表达载体示意图;B 为通过考马斯蓝染色对纯化的重组 wtRBD 蛋白进行纯度分析;C 为应用抗 RBD(SARS-CoV-2)和抗 His 抗体进行的蛋白质印迹分析。

图 1 毕赤酵母重组 wtRBD 蛋白的表达与验证

表 3 LC-MS 分析 wtRBD 蛋白的糖基化位点		
糖基化位点	肽	
O-糖基化位点	a	ISNCVADYSVL <sup>371</sup> YN <sup>373</sup> AS <sup>375</sup> FS <sup>376</sup> T <sup>376</sup> FK
	b	LPDDFTGCVIAWNS <sup>438</sup> NNL
	c	VVVL <sup>514</sup> S <sup>514</sup> FELLHAPATVCGPK
N-糖基化位点	d	NNLDSKVGGN <sup>148</sup> YN <sup>150</sup> YLYR

注:红色字母及数字表示具有 O-糖基化(肽 a-c)或 N-糖基化的氨基酸(肽 d);a 和 b 表示可能的 O-糖基化位点;c 表示已鉴定的 O-糖基化位点;d 表示 N-糖基化位点。

**2.3 接种 wtRBD 小鼠抗血清对 SARS-CoV-2 变异株的交叉反应性** 为分析不同接种间隔时间接种 wtRBD 小鼠抗血清是否能有效预防性免疫 SARS-CoV-2 变异株,收集免疫方案 1、2 接种 wtRBD 小鼠的终点血清样品检测总 IgG 抗体和 NAb 滴度,结果显示,两种免疫方案下,wtRBD 诱导 IgG 抗体以相似的效率结合野生型、Beta(B. 1. 351)和 Delta(B. 1. 617. 2)变体,见图 4A;在免疫方案 1 中,与野生型 SARS-CoV-2 的 NAb 滴度相比,针对 Beta 变体的 NAb 滴度差异无统计学意义( $P>0.05$ ),然而在接种 30 和 60  $\mu\text{g}$  wtRBD 的组中,针对 Delta 变体的 NAb

滴度分别降低了 2.0 倍和 2.5 倍,见图 4B;此外,与免疫方案 2 比较,免疫方案 1 所获得的 NAb 滴度明显更高,且总体来看,Delta 变体较野生型和 Beta 变体表现出更强的免疫逃逸能力,见图 4B。

**2.4 毕赤酵母表达的 Delta RBD 蛋白诱导小鼠免疫应答** 鉴于 Delta 变体较强的免疫逃逸能力,本研究进一步考察了 Delta RBD 蛋白的疫苗有效性,其表达载体示意图见图 5A,纯度分析及蛋白质印迹分析见图 5B、C。为评估毕赤酵母表达的 Delta RBD 的免疫原性,设计免疫方案 3 见图 6A,Delta RBD 二次免疫后特异性 IgG 抗体明显升高,第 3 次免疫后进一步升高,见图 6B,在研究终点(第 84 天),血清中 Delta RBD 特异性 IgG 的几何平均滴度为 1 028 641 (7 844~3 720 491),与使用 wtRBD 免疫下定量的几何平均滴度相似,见图 6C,但针对 Delta 变体的 NAb 几何平均滴度为 32 255(2 167~88 084),见图 6D,相较 wtRBD 免疫增加了 5.2 倍,后者为 6 202(899~16 199),见图 6E。

**2.5 铝佐剂+CpG 佐剂联合 Delta RBD 对免疫反应的影响** 将小鼠分为 6 组见表 4,按照免疫方案 3 进

行免疫。结果显示,第 2 次免疫后,无论是 5  $\mu\text{g}$  抗原组还是 30  $\mu\text{g}$  抗原组,采用铝佐剂+CpG 组别血清中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度明显高于单独采用铝佐剂组;无论是铝佐剂+CpG 组还是单独采用铝佐剂组,5  $\mu\text{g}$  抗原组和 30  $\mu\text{g}$  抗原组中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度基本相当;第 3 次免疫后,5  $\mu\text{g}$  抗原组与 30  $\mu\text{g}$  抗原组中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度差异无统计

学意义( $P>0.05$ ),见图 7A。采用研究终点血清样本检测针对 Delta 变体的 NAb 滴度,结果显示,在采用 5  $\mu\text{g}$  Delta RBD 免疫情况下,4 组的 NAb 滴度为 3 组的 9.8 倍(385 546 *vs.* 39 494),在采用 30  $\mu\text{g}$  Delta RBD 免疫情况下,6 组的 NAb 滴度为 5 组的 10.4 倍(335 614 *vs.* 32 255),见图 7B。

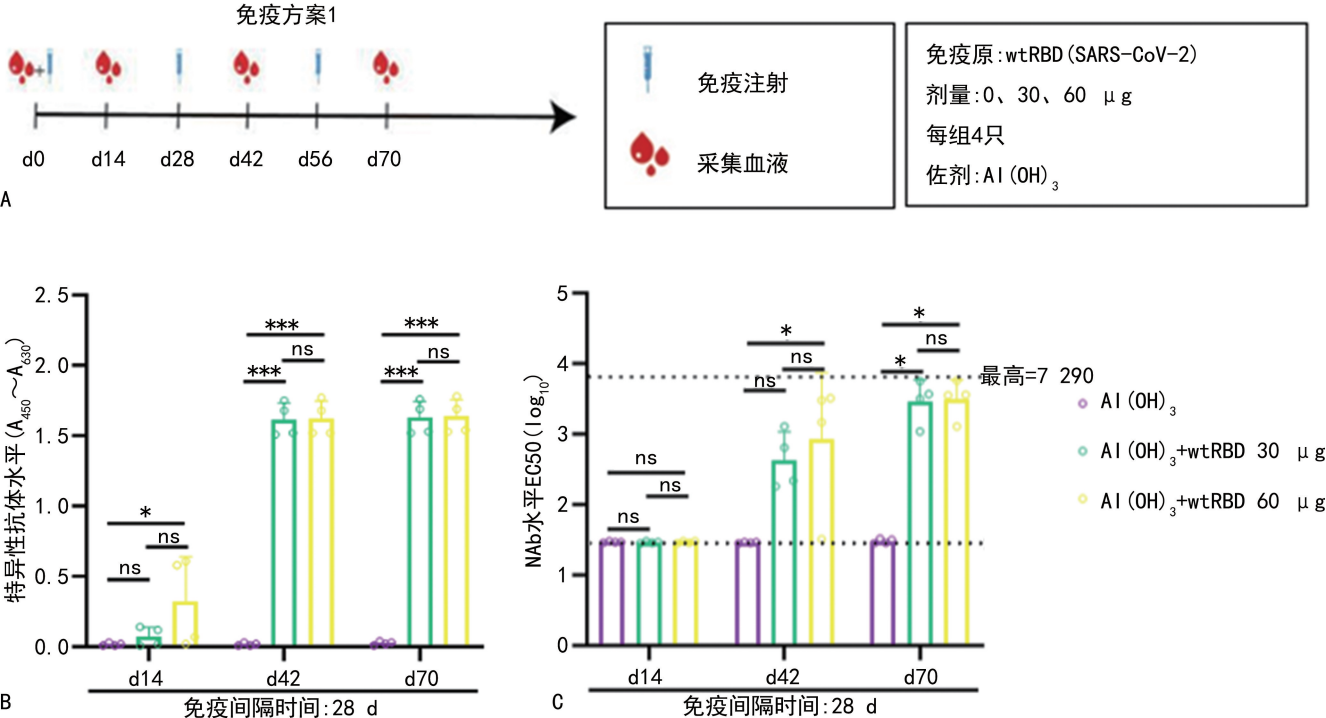


图 2 毕赤酵母表达的 wtRBD 免疫方案 1 诱导小鼠免疫应答

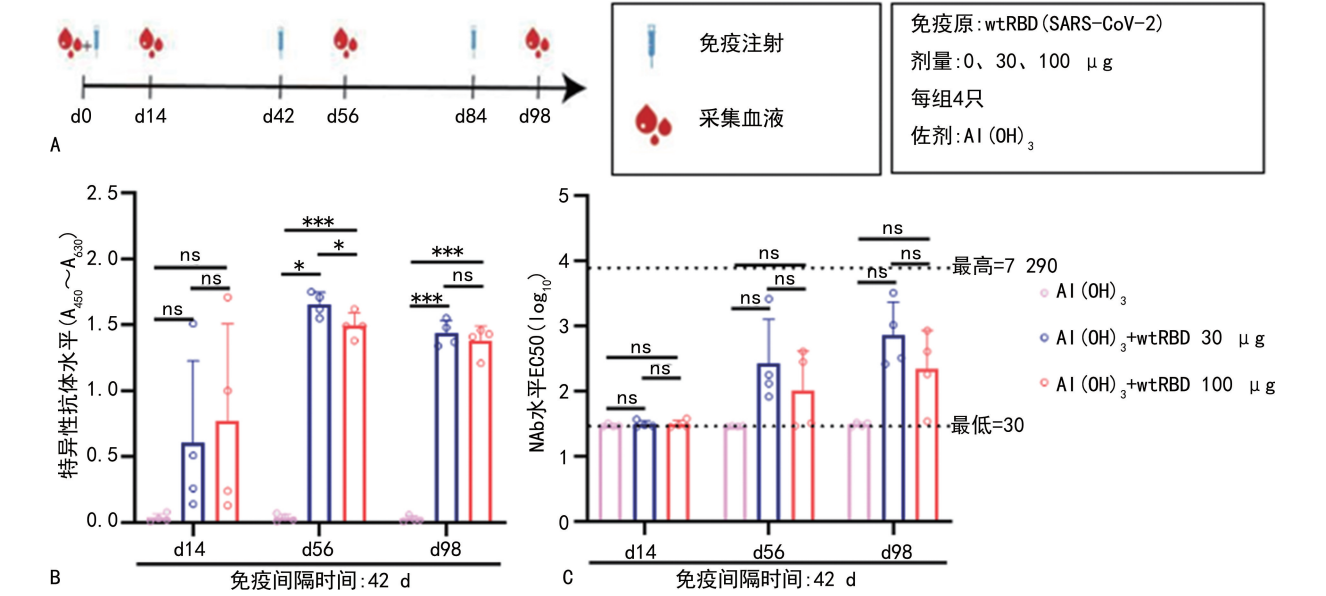
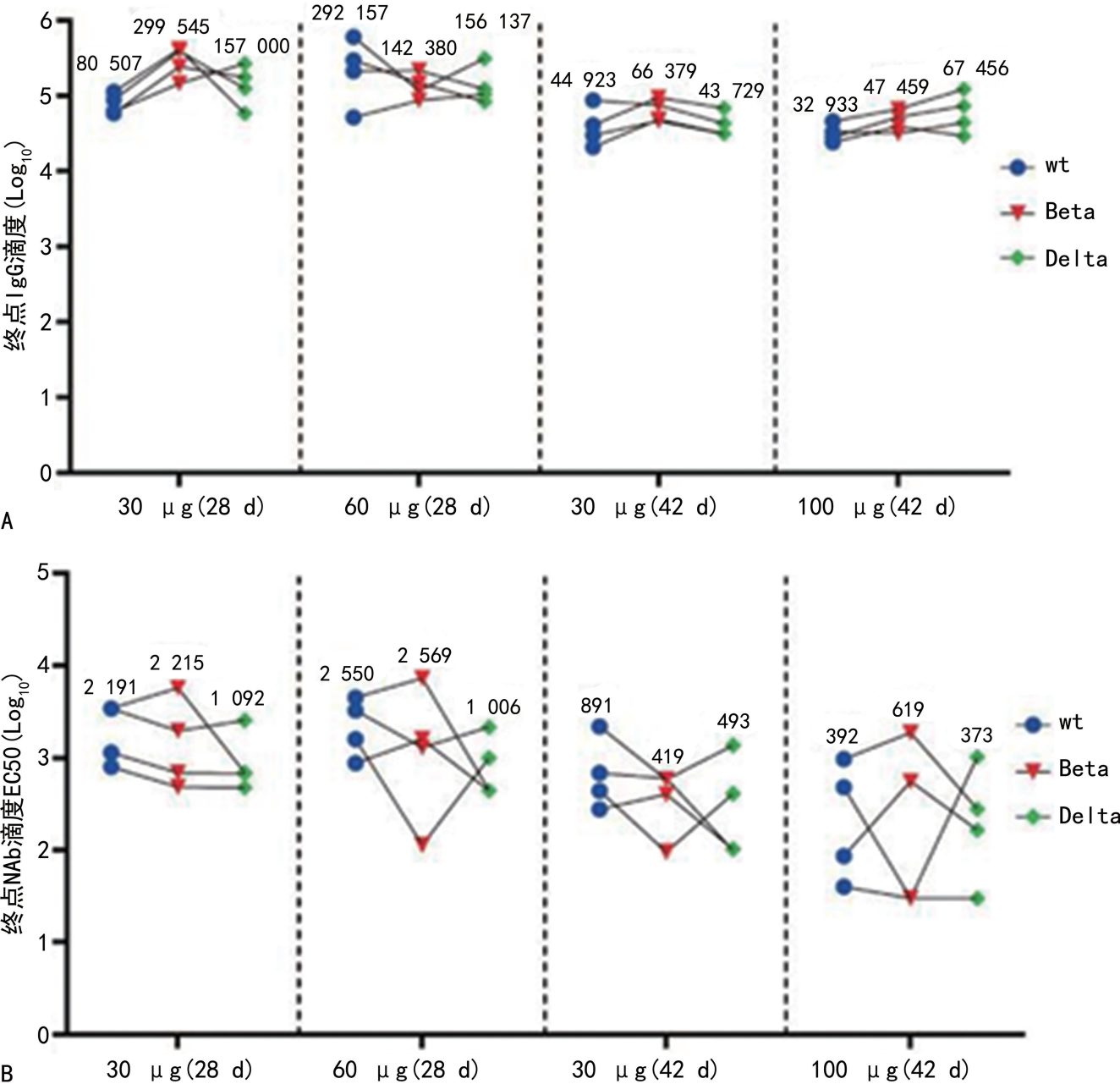


图 3 毕赤酵母表达的 wtRBD 免疫方案 2 诱导小鼠免疫应答

表 4 铝佐剂 + CpG 佐剂联合 Delta RBD 处理小鼠分组

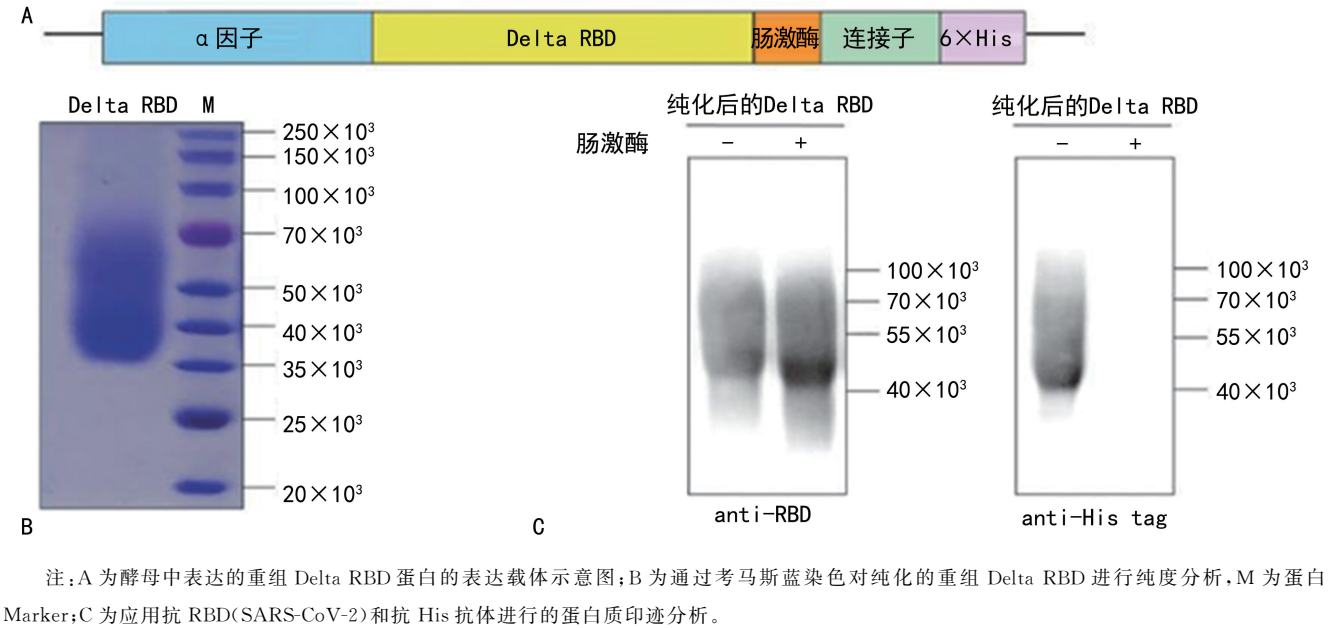
序号	n	免疫原(SARS-CoV-2)	剂量(μg)	佐剂
1	5	—	—	Al(OH) <sub>3</sub>
2	5	—	—	Al(OH) <sub>3</sub> + CpG
3	3	Delta RBD	5	Al(OH) <sub>3</sub>
4	5	Delta RBD	5	Al(OH) <sub>3</sub> + CpG
5	5	Delta RBD	30	Al(OH) <sub>3</sub>
6	5	Delta RBD	30	Al(OH) <sub>3</sub> + CpG

注：—表示无数据。



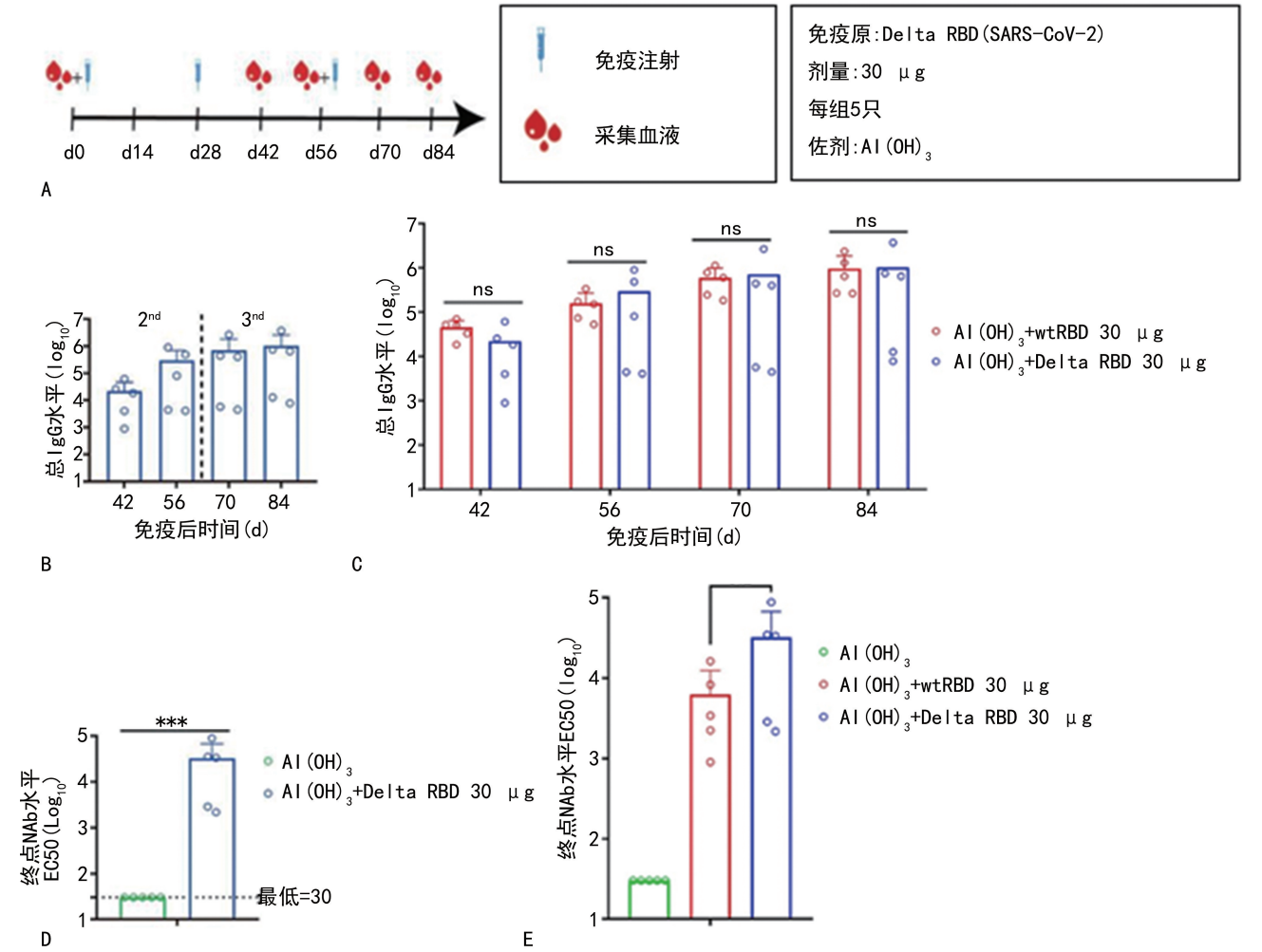
注：A 为针对 Beta 变体和 Delta 变体的 IgG 结合抗体的滴度；B 为针对 Beta 变体和 Delta 变体的 NAb 滴度；n=4，图中标注数字为几何平均滴度值。

图 4 接种 wtRBD 小鼠抗血清对 SARS-CoV-2 变异株的交叉反应性



注:A为酵母中表达的重组 Delta RBD 蛋白的表达载体示意图;B为通过考马斯蓝染色对纯化的重组 Delta RBD 进行纯度分析,M 为蛋白 Marker;C 为应用抗 RBD(SARS-CoV-2)和抗 His 抗体进行的蛋白质印迹分析。

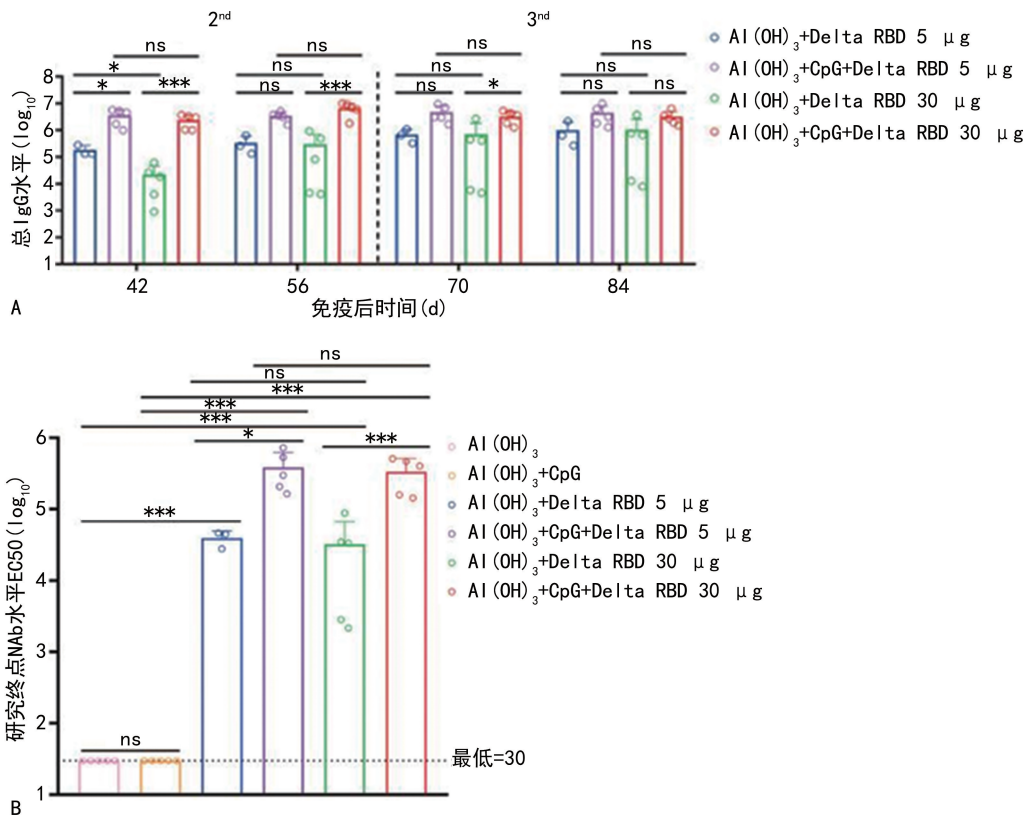
图 5 毕赤酵母重组 Delta RBD 蛋白的表达与验证



注:A为免疫方案 3 示意图;B为血清中 Delta RBD 特异性结合 IgG 抗体的检测结果(2<sup>nd</sup> 和 3<sup>nd</sup> 分别表示第 2 次和第 3 次免疫后);C为用 wtRBD(红色)或 Delta RBD(蓝色)免疫小鼠血清中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度的检测;D为研究终点(第 84 天),血清中针对 Delta 变体的 Nab 滴度的检测;E为研究终点(第 84 天),用 wtRBD(红色)或 Delta RBD(蓝色)免疫小鼠血清中针对 Delta 变体的 Nab 滴度的检测; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , ns 为  $P > 0.05$ 。

图 6 毕赤酵母表达的 Delta RBD 蛋白诱导小鼠免疫应答





注:A 为血清中 Delta RBD 特异性 IgG 抗体滴度的检测(2<sup>nd</sup> 和 3<sup>rd</sup> 分别表示第 2 次和第 3 次免疫后);B 为用研究终点血清样品中检测针对 Delta 变体的 NAb 滴度; \*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$ , ns 为  $P>0.05$ 。

图 7 铝佐剂+CpG 佐剂联合 Delta RBD 对免疫反应的影响

3 讨 论

当前世界各地已经使用了多种疫苗来预防 COVID-19,其效果较好。最新统计数据显示,全球 70.0% 的人至少接种了 1 剂 COVID-19 疫苗,但在某些低收入国家,至少接种了 1 剂 COVID-19 疫苗的人数仍不足 10%<sup>[13]</sup>。这可能也是 Beta、Delta 和 Omicron 变体曾在南非引起 3 个流行高峰的重要原因之一。国家卫生健康委员会也提出,当前 SARS-CoV-2 仍在不断变异,在严格落实“乙类乙管”各项措施的同时,需持续加强公共卫生、疾病防控、医疗服务体系建设,以防止新型变异株造成我国疫情大幅反弹的发生。鉴于此,持续优化疫苗免疫方案仍具有重要的现实意义。

SARS-CoV-2 的 RBD 区具有很强的诱导 NAb 的能力,因此被公认为是 COVID-19 疫苗的主要靶抗原之一。而对于 SARS-CoV-2 RBD 的重组表达,已有研究表明,酵母细胞是一种比哺乳动物细胞更具可扩展性和成本效益的表达系统<sup>[14]</sup>。本研究采用毕赤酵母系统进行 RBD 蛋白的重组表达,为了增加蛋白表达量,在进行基因设计时于 RBD 的 N 末端插入了  $\alpha$  因子信号肽。经 SDS-PAGE 电泳和蛋白质印迹分析检测结果表明,无论目标蛋白是 wtRBD 还是 Delta RBD,均能通过毕赤酵母系统获得满意过表达,说明  $\alpha$  因子信号肽的插入能高效引导目标蛋白的翻译。另

外为了便于重组 RBD 蛋白的纯化,于 C 末端插入了 His 标签,然而,很少有人关注纯化过程中标签的消除,这可能会在临床应用中引起安全问题。为了克服这一限制,故在 RBD 和 His 标签之间增加了一个高效且特异性的 EK 切割位点,结果显示,经 EK 消化后未检测到 His 标签。本研究获得的重组 wtRBD 蛋白的相对分子质量为  $45\times10^3$ ,比以往研究中哺乳动物细胞和昆虫细胞中表达的重组 RBD 蛋白相对分子质量相对更高<sup>[15]</sup>。推测可能是由于毕赤酵母表达的蛋白存在大量的翻译后修饰,包括糖基化等,这需要进一步验证。

由于重组蛋白疫苗的免疫原性较低,通常需要多次免疫<sup>[4]</sup>。因此,笔者探讨了疫苗免疫效能是否会受到免疫间隔时间的影响。在本研究中,以 28 d 或 42 d 的间隔进行 3 次 wtRBD 免疫接种。与 42 d 间隔时间相比,28 d 间隔时间的 IgG 抗体滴度增加了 1.8 倍(44 923 *vs.* 80 507)。同样,间隔 28 d 的 3 剂免疫后,针对 Delta 变体的 NAb 几何平均滴度比间隔 42 d 高 2.5 倍(2 191 *vs.* 891)。结果表明,28 d 的免疫间隔比 42 d 的免疫间隔可引发更多的保护性免疫反应。特别需要注意的是,当前预防 SARS-CoV-2 的主要不确定因素是某些可能出现的新变种,因此关注的重点应是曾被世界卫生组织列为“须关切变体(VOC)”的变

异毒株,Delta 变异株即为其中之一。本研究发现,用 wtRBD 疫苗免疫的小鼠血清中针对 Delta 变体的 NAb 滴度明显降低,这与以前的研究一致<sup>[15]</sup>。为解决该问题,研究中笔者还制备了 Delta RBD 重组蛋白疫苗,并联合铝佐剂对小鼠进行免疫,结果发现,该疫苗针对 Delta 变体引发了强烈的免疫反应,其针对 Delta 变体的 NAb 几何平均滴度达到了 32 255 (2 167~88 084)。

为进一步提高重组 Delta RBD 蛋白的免疫原性,本研究将新型 CpG 佐剂与传统铝佐剂联合应用。疟疾疫苗 MSP1 42-C1 和 COVID-19 疫苗 SCB-2019 临床试验的证据表明,CpG 是一种安全有效的佐剂,使用铝佐剂和 CpG 佐剂的组合可以诱导产生更多的 NAb。本研究结果显示,在采用 5  $\mu$ g 或 30  $\mu$ g Delta RBD 免疫情况下,铝佐剂+CpG 组的 NAb 滴度均为单独采用铝佐剂组的 10 倍,该结果与其他研究基本一致<sup>[15]</sup>。提示 CpG 佐剂的加入更有助于诱导针对 SARS-CoV-2 及其变体的高度保护性免疫应答。此外,第 3 次免疫后,5  $\mu$ g 抗原组与 30  $\mu$ g 抗原组中 Delta RBD 特异性 IgG 滴度无明显差异,表明使用 5  $\mu$ g 的 Delta RBD 即可达到保护性免疫应答水平。同时,如此低剂量的抗原也意味着将 Delta RBD 作为抗 Delta SARS-CoV-2 变异株的候选疫苗具有巨大潜力。

综上所述,本研究进一步明确了采用毕赤酵母系统生产 SARS-CoV-2 RBD 蛋白并以此为抗原制备重组蛋白疫苗的可行性,其中,基于毕赤酵母制备的 Delta RBD 重组蛋白与铝佐剂+CpG 佐剂的联合免疫能够获得更高滴度的 NAb 以对 SARS-CoV-2 及其变体发挥免疫作用,可为 SARS-CoV-2 疫苗的持续优化研究提供一定参考。

参考文献

[1] 李雄雄,陈玥如,王宇,等. SARS-CoV-2 受体结合域蛋白的表达、纯化和鉴定[J]. 微生物学免疫学进展,2021,49 (5):1-6.

[2] WANG Q H,ZHANG Y F,WU L L,et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2[J]. Cell,2020,181(4):894-904.

[3] AHMAD M,HIRZ M,PICHLER H,et al. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2014,98(12):5301-5317.

[4] BRITO L A,O'HAGAN D T. Designing and building the

next generation of improved vaccine adjuvants[J]. J Control Release,2014,190:563-579.

[5] SKWARCZYNSKI M,TOTH I. Micro and nanotechnology in vaccine development; nanomaterials based on lipids for vaccine development[M]. New York:Elsevier William Andrew,2017.

[6] FIOLET T,KHERABI Y,MACDONALD CJ,et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics,efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern;a narrative review [J]. Clin Microbiol Infect, 2022,28(2):202-221.

[7] LIANG Z,ZHU H,WANG X,et al. Adjuvants for coronavirus vaccines[J]. Front Immunol,2020,11:589833.

[8] MBOW M L,DE GREGORIO E,VALIANTE N M,et al. New adjuvants for human vaccines[J]. Current Opinion Immunol,2010,22(3):411-416.

[9] VOLLMER J,KRIEG A M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists [J]. Adv Drug Deliv Rev,2009,61(3):195-204.

[10] KUO T Y,MY L,COFFMAN R L,et al. Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19[J]. Sci Rep, 2020,10(1):20085.

[11] LI W,LI X,ZHAO D,et al. Heterologous prime-boost with AdC68- and mRNA-based COVID-19 vaccines elicit potent immune responses in mice[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):419.

[12] LIU H T,ZHOU C L,AN J,et al. Development of recombinant COVID-19 vaccine based on CHO-produced, prefusion spike trimer and alum/ CpG adjuvants[J]. Vaccine,2021,39(48):7001-7011.

[13] Our World in Data. Share of people who received at least one dose of COVID-19 vaccine [EB/OL]. (2023-04-01) [ 2023-06-10 ]. <https://ourworldindata.org/grapher/share-people-vaccinated-covid?tab=map&facet=entity&country=~MDG>.

[14] ZANG J,ZHU Y,ZHOU Y,et al. Yeast-produced RBD-based recombinant protein vaccines elicit broadly neutralizing antibodies and durable protective immunity against SARS-CoV-2 infection[J]. Cell Discovery, 2021, 7 (1): 71.

[15] GEOFF P,LIN C,JOAN L C,et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris[J]. Curr Opin Biotechnol,2002,13(4):329-332.