



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Public Health—Article

糖基工程毕赤酵母制备的 SARS-CoV-2 S 蛋白受体结合区亚单位疫苗可激发中和抗体反应

刘波^{a, #}, 殷瑛^{a, #}, 刘雨潇^{b, c, #}, 王甜甜^a, 孙鹏^a, 欧阳秦^d, 巩新^a, 侯旭宸^a, 张军^a, 任洪广^a, 罗士强^{a, e}, 柯倩^{a, e}, 姚咏明^{b, *}, 徐俊杰^{a, *}, 吴军^{a, *}

^a Department of Microorganism Engineering, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

^b Medical Innovation Research Division & Fourth Medical Center of the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

^c Department of Neurosurgery, First Medical Center of the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

^d Shenzhen Taihe Biotechnology Co. Ltd., Shenzhen 518001, China

^e Institute of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230000, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2021

Revised 5 May 2021

Accepted 11 June 2021

Available online 13 July 2021

关键词

冠状病毒

SARS-CoV-2

疫苗

酵母

受体结合区 (RBD)

摘要

2020年至今,新型冠状病毒 SARS-CoV-2 已经在全球大流行。新冠疫苗被寄予厚望用以减轻防控压力,成为解决疫情危机的有效手段之一。SARS-CoV-2 通过 S 蛋白受体结合区 (RBD) 与宿主细胞 ACE2 受体结合, 侵染机体。本文提供了一种利用新型糖基工程毕赤酵母表达系统, 制备基于 S 蛋白 RBD 重组亚单位候选疫苗的方法。该糖基工程酵母的糖基化修饰途径经过人源化改造后, 具有类似于哺乳动物细胞糖基化修饰特点。研究发现, RBD 候选疫苗可以有效地诱导小鼠产生高滴度的抗 RBD 特异性抗体, 含 Al (OH)₃ 和 CpG 双佐剂的 RBD 免疫组小鼠产生的特异性抗体滴度和病毒中和抗体滴度显著地高于含 Al (OH)₃ 的单佐剂组, 且中和抗体可以在小鼠体内持续 6 个月以上。综上所述, 本文利用糖基工程酵母制备了 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 糖蛋白疫苗, 该疫苗能够诱导小鼠产生高滴度中和抗体, 同时提供了一种可制备具有无岩藻糖的复杂型 N-糖基化修饰重组蛋白的方法。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

截至 2021 年 1 月 25 日, 新冠病毒全球大流行已导致超过 9900 万人被感染、213 万人死亡[1]。SARS-CoV-2 通过 S 蛋白的受体结合区 (RBD) 与受体血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 结合[2], S 蛋白构象改变触发膜融合, 从而实现病毒侵入细胞。研究发现, RBD 特异性抗体可以通过与 RBD 的“开放”构象以及“闭合”构象结合, 或

者与 ACE2 非直接相互作用的其他区域结合, 从而阻断 RBD 与 ACE2 的结合[3]。研究发现 S 蛋白 RBD 具有免疫优势, 并且 90% 的中和抗体针对 S 蛋白 RBD 区, 表明在疫苗设计时, 如果诱导机体产生针对 S 蛋白 RBD 区的抗体可能会有效地阻止病毒感染[4–5]。因此, 诱导免疫系统产生针对 S 蛋白 RBD 的特异性抗体有望预防病毒感染。

RBD 包含 N331 和 N343 两个糖基化位点[6], 目前以 S

* Corresponding authors.

E-mail addresses: c_ff@sina.com (Y. Yao), xujunjie@sina.com (J. Xu), junwu1969@163.com (J. Wu).

These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 13(6): 107–115

引用本文: Bo Liu, Ying Yin, Yuxiao Liu, Tiantian Wang, Peng Sun, Yangqin Ou, Xin Gong, Xuchen Hou, Jun Zhang, Hongguang Ren, Shiqiang Luo, Qian Ke, Yongming Yao, Junjie Xu, Jun Wu. A Vaccine Based on the Receptor-Binding Domain of the Spike Protein Expressed in Glycoengineered *Pichia pastoris* Targeting SARS-CoV-2 Stimulates Neutralizing and Protective Antibody Responses. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.06.012>

蛋白或RBD蛋白为抗原的亚单位疫苗均以昆虫细胞或哺乳动物细胞为生产系统[4-5]，这两种生产平台生产周期长、成本相对较高。酵母作为一种简单的真核生物具有一定的蛋白质翻译后修饰能力，并且生长速度快、生产成本低，是一种理想的蛋白质制备平台[7-8]。然而，酵母的N-糖基化修饰为过度甘露糖基化修饰，会造成蛋白表位遮蔽以及高级结构改变，从而影响疫苗的免疫原性和保护效果。通过对酵母糖基工程改造，可以使得酵母具有哺乳动物细胞糖基化修饰能力，同时兼顾生长快速、低成本及应急能力强的优点[9-10]。前期研究表明，利用糖基工程酵母表达制备的H7N9血凝素HA糖蛋白疫苗具有良好的免疫原性和保护效果[11]。

在传播过程中，病毒持续变异使病毒的传播更具有优势。例如，S蛋白D614G突变可增加病毒的传染性，N493K突变可通过增加一对盐桥增强RBD与hACE2受体的亲和力[12]。N493K突变还可降低RBD与一系列单克隆抗体（包括正在开展临床试验的REGN10933、REGN10987、LY-CoV555和S309）的结合能力，从而实现免疫逃逸。由此可见，开发一款安全且高效的疫苗是阻止病毒传播最有效的手段之一。糖基工程酵母系统可实现针对突变株的候选疫苗的研制，并可实现疫苗的规模化制备。

本研究利用糖基工程酵母制备了SARS-CoV-2 S-RBD糖蛋白，辅以Al(OH)₃和CpG佐剂，能够诱导小鼠产生中和抗体。

佐剂作为疫苗的组成部分可有效增强免疫反应的强度和持久性。目前，由于铝佐剂具有对多种疫苗有效、安全性好和成本低的特点，成为应用最广泛的疫苗佐剂。被上市批准的疫苗中常用铝佐剂分为氢氧化铝和磷酸铝[13]。尽管铝佐剂被使用多年，其免疫增强机制仍未被完全阐明。目前铝佐剂最被认可的免疫增强机制为“仓库效应”，即可在免疫位点缓慢释放抗原。铝佐剂倾向于激活Th2细胞免疫反应。CpG寡脱氧核糖核酸是一种新型疫苗佐剂，为TLR9激动剂，并可激活Th1细胞免疫反应。CpG根据结构特点可分为三种类型，主要作用于人外周血单核细胞（PBMC）——特别是B细胞和浆细胞样树突状细胞[14]。CpG1018是一种CpG-B类寡脱氧核糖核酸佐剂，已作为新冠疫苗的潜在佐剂进入临床实验阶段。基于CpG佐剂的乙肝疫苗Heplisav-B可通过两针免疫起效，比其他乙肝疫苗免疫程序更简单，并已获得在18岁以上成年人中使用[15]。

2. 材料与方法

2.1. 酵母菌株、细菌菌株、质粒以及材料

根据此前报道的方法[16]建立糖基工程酵母菌株，本文研究团队前期发表的论文也有相关阐述。细菌菌株在含有1.5%琼脂的Luria-Bertani (LB)培养基中培养。用于克隆的大肠杆菌DH5 α (TakaRa Biotech, 中国)在37 °C下培养。酵母抽提物、琼脂和胰蛋白胍购自OXOID公司(英国)；不含氨基酸的酵母氮基购自Difco公司(美国)；胎牛血清(FBS)购自北京千兆新业生物科技有限公司；T4 DNA连接酶、限制性内切酶、DNA Marker、Q5 DNA聚合酶和蛋白质Marker购自New England Biolabs公司(美国)；抗SARS-CoV RBD抗体和辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔IgG抗体均购自北京义翘神州科技股份有限公司；DNA提取试剂盒和酵母基因组DNA试剂盒购自Sigma公司(美国)。

2.2. SARS-CoV-2 RBD基因的克隆与表达

SARS-CoV-2 RBD基因(GenBank登录号MN908947.3)由南京擎科生物科技有限公司进行优化并合成。RBD基因克隆到pPICZ α A载体的XhoI和NotI位点，以产生由AOX I启动子驱动的pPICZ α A-RBD表达载体。将Bg/III线性化的质粒pPICZ α A-RBD通过电化学转化至糖基工程酵母，所得酵母被命名为Glycoeng-yeast/RBD。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)和蛋白印迹法(Western blot)进行蛋白表达检测，使用抗SARS-CoV RBD抗体和HRP山羊抗兔IgG抗体(稀释比为1:2500)筛选Glycoeng-yeast/RBD酵母阳性表达克隆。

2.3. 酵母发酵和RBD纯化程序

50 L发酵罐的发酵方法按照之前所述的方法进行[17]。简言之，种子在200 mL酵母提取物-蛋白胍-葡萄糖(YPD)培养基中培养。发酵培养基每升含有10 g酵母提取物、20 g蛋白胍、40 g甘油、 4×10^{-3} g生物素、4.47 g Na₂HPO₄、8.22 g NaH₂PO₄和13.4 g酵母氮基(YNB)。使用以下条件进行发酵，利用氨水将pH值控制在6.4，将温度设置为25 °C。溶氧回升，经10 min的营养缺乏培养后，开始甲醇补料[100%甲醇加12 mL·L⁻¹毕赤酵母微量矿物质(PTM1)盐]。甲醇诱导持续45~50 h。以8000 r·min⁻¹的速度离心25 min，回收发酵上清液，用于蛋白纯化。样品依次经过弱阳离子交换(Capto MMC; GE Healthcare, 美国)、疏水层析(Phenyl Sepharose High Performance; GE Healthcare, 美国)、强阴离子交换(Source 30Q; GE

Healthcare, 美国)、强阳离子交换 (Source 30S; GE Healthcare, 美国) 和凝胶排阻层析 (SEC; Superdex-200; GE Healthcare, 美国), 最终获得高纯度RBD蛋白。

2.4. SARS-CoV-2 RBD 蛋白特征

使用12% SDS-PAGE分析纯化的重组RBD, 并在37 °C下用肽N-糖苷酶F (PNGaseF) 处理。通过SEC-高效液相色谱 (SEC-HPLC) 和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析RBD的纯度。在280 nm处记录吸光度 (安捷伦1260 HPLC)。使用C8 RP-HPLC以0~100%流动相B的梯度在40 min内分析重组RBD。流动相A为0.1%甲酸 (FA), 流动相B为95%乙腈和0.1% FA。

通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定酵母细胞产生的RBD和哺乳动物细胞产生的RBD与hACE2的结合能力。将ACE2用缓冲液 (50 mmol·L⁻¹碳酸盐, pH值为9.6) 稀释至10 μg·mL⁻¹, 每孔100 μL加入ELISA板中, 4 °C过夜。过夜后, 用含有0.1%吐温-20的磷酸盐缓冲液 (PBST) 清洗过夜放置的ELISA板4次。接下来, 将ELISA板每孔加入300 μL 5%脱脂牛奶 (PBST稀释), 37 °C孵育1 h。添加连续稀释的重组RBD, 在37 °C下培养1 h, PBST洗板4次。每孔100 μL加入抗SARS-CoV-2 RBD抗体 (稀释比为1:2000), 在37 °C下培养1 h后, PBST洗板4次。每孔100 μL加入山羊抗兔IgG HRP结合抗体 (稀释比为1:2000), 在37 °C下孵育1 h后, PBST洗板4次。然后用每孔100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB单组份显色液) 显影15 min, 后添加每孔50 μL的2 mol·L⁻¹ H₂SO₄终止反应。酶标仪450 nm读板。

2.5. 糖型分析实验

DNA测序仪辅助-荧光团辅助碳水化合物电泳 (DSA-FACE) 方法用于检测RBD上的低聚糖链。简言之, 糖蛋白用PNGaseF处理, 糖链用荧光标记物8-氨基苣-1,3,6-三磺酸 (APTS) 标记。样本在ABI 3100 DNA测序仪 (美国) 下分离。

2.6. 疫苗免疫原性评价

BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于北京生物工程研究所动物中心。所有动物实验均经北京生物工程研究所机构动物伦理和使用委员会批准, 并按照该委员会的机构指南进行。实验动物福利伦理编号为IACUC-DWZX-2020-039。

6~8周龄的雌性BALB/c小鼠被随机分为3组 (n = 10), 作为第一批动物实验: 10 μg RBD/100 μg Al(OH)₃ (CRODA, 丹麦) 组; 10 μg RBD/100 μg Al(OH)₃/25 μg

CpG组; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组。在第0天、第14天和第28天, 用100 μL免疫小鼠的后腿肌肉。

为了确定RBD的最佳免疫剂量, 将6~8周龄的BALB/c雌性小鼠随机分为4组 (n = 5), 作为第二批动物实验: 10 μg RBD/50 μg Al(OH)₃/25 μg CpG组; 5 μg RBD/50 μg Al(OH)₃/25 μg CpG组; 2.5 μg RBD/50 μg Al(OH)₃/25 μg CpG组; PBS对照组。在第0天和第14天, 用100 μL的10 μg RBD/50 μg Al(OH)₃/25 μg CpG免疫小鼠的后腿肌肉。

为了确定最佳免疫策略, 在不同时间 (n = 5) 对BALB/c小鼠进行免疫, 作为第三批动物实验: 分别在第0天和第14天进两次免疫; 分别在第0天和第21天进行两次免疫; 分别在第0天和第28天进行两次免疫; 分别在第0天、第14天和第28天进行三次免疫。用100 μL的10 μg RBD/50 μg Al(OH)₃/25 μg CpG免疫小鼠后腿肌肉。

2.7. 组织学和免疫组织化学

在第一批动物实验中, 每组的5只动物在最后一次疫苗注射4周后被处死。收集包括心脏、肺、肝脏和脾脏在内的器官, 用甲醛固定、石蜡包埋, 并切成薄片。这些切片用苏木精和曙红染色, 用光学显微镜观察, 并进行组织学分析。

2.8. RBD特异性血清抗体分析

第一批动物实验中每组的5只动物在第14天、28天、42天、98天、154天和182天 (第2周、4周、6周、14周、22周和26周) 取血。第二批和第三批动物实验的动物在第一次和最后一次接种疫苗两周后取血。血液在室温下凝固1~2 h后, 样品在4 °C下以5000 r·min⁻¹离心15 min。收集上清并在-20 °C下储存。将重组RBD蛋白用包被缓冲液 (50 mmol·L⁻¹碳酸盐, pH值为9.6) 稀释至2 μg·mL⁻¹后包被于平底96孔ELISA板上, 4 °C过夜。用含有0.1%吐温-20的PBST清洗过夜放置的ELISA板4次。接下来, 将ELISA板每孔加入300 μL 5%的脱脂牛奶, 37 °C孵育1 h。添加连续稀释的小鼠血清, 在37 °C下培养1 h, 然后洗涤4次。每孔100 μL加入山羊抗鼠IgG HRP结合抗体 (稀释比1:4000), 在37 °C下孵育1 h后, PBST洗板4次。然后用每孔100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB单组份显色液) 显影15 min, 后添加每孔50 μL的2 mol·L⁻¹ H₂SO₄终止反应。酶标仪450 nm读板。

2.9. SARS-CoV-2中和试验

在生物安全等级3 (BSL-3) 设施中, 使用病毒中和试验检测免疫小鼠血清的中和活性[16]。将连续稀释的血

清与 SARS-CoV-2 毒株 (IME-BJ01) 在 37 °C 下培养 2 h。此后, 将病毒血清复合物转移到由 96 孔培养板培养的 Vero E6 细胞上, 然后将接种的平板培养 72 h, 并用 0.05% 结晶紫染色 35 min。添加脱色溶液后, 在 570 nm 或 630 nm 外测量光密度 (OD) 值, 使用 Reed-Muench 方法计算中和结果, 以估计获得一半感染最大中和所需的血清稀释度 [50% 有效浓度 (EC_{50}) 滴度]。血清阳性定义为滴度大于 16。将初始血清稀释度 (1 : 16) 设定为分析的置信限。

对血清抗 SARS-CoV-2 501Y.V2 以及 B.1.1.7 假病毒的中和和活性进行检测。将假病毒与连续稀释的供试品 (以 3 倍分步方式进行 6 次稀释) 在 37 °C 条件下培养 1 h, 同时培养 6 份病毒对照和细胞对照孔。然后, 将用胰蛋白酶消化后的细胞添加到每个孔中, 在 37 °C 的 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 测量发光, 如假病毒滴定部分所述。使用 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., 美国) 通过非线性回归, 即四参数拟合取对数 (抑制值) 计算 EC_{50} 值。

3. 结果

3.1. 糖基工程酵母表达 SARS-CoV-2 RBD 蛋白

巴斯德毕赤酵母经糖基化修饰途径改造, 具备了哺乳

动物细胞 *N*-糖基化修饰能力; 本文利用该糖基工程酵母表达制备了 SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD [12]。SARS-CoV-2 的 RBD 基因序列编码蛋白包含 223 个氨基酸 (S 蛋白序列 319-541 氨基酸残基), 理论分子量为 25 kDa, 并包含两个 *N*-糖基化位点 (N331 和 N343)。图 1 (a)、(b) 分别表示包含 RBD 的 S 蛋白基因及 RBD 基因表达载体。RBD 基因插入 pPICZ α A 载体的 *XhoI* 和 *NotI* 位点, 构建形成载体 pPICZ α A-RBD (SARS-CoV-2) [图 1 (b)]。载体线性化后电转化入糖基工程酵母, 并筛选得到目的菌株 Glycoeng-yeast/RBD。Western blot 结果显示表达条带在 30 kDa [图 1 (c)]。SDS-PAGE 显示条带并不均一, 表达条带分子量 (30 kDa) 比理论值 (25 kDa) 高, 主要是因为 RBD 发生了糖基化修饰。

3.2. 糖基工程毕赤酵母中高效纯化的 RBD 蛋白

本研究建立了 RBD 蛋白的 4 L 规模酵母发酵工艺, 整个发酵周期持续 5 d 时间 [图 2 (a)]。由于 RBD 有 α -factor 分泌信号肽 [图 1 (b)], 因此表达的 RBD 会分泌到培养上清中。将不同时间点诱导表达的培养上清进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 诱导 48 h 后的目的蛋白表达水平较高 [图 2 (b)]。分泌到发酵上清中的 RBD 依次经过阳

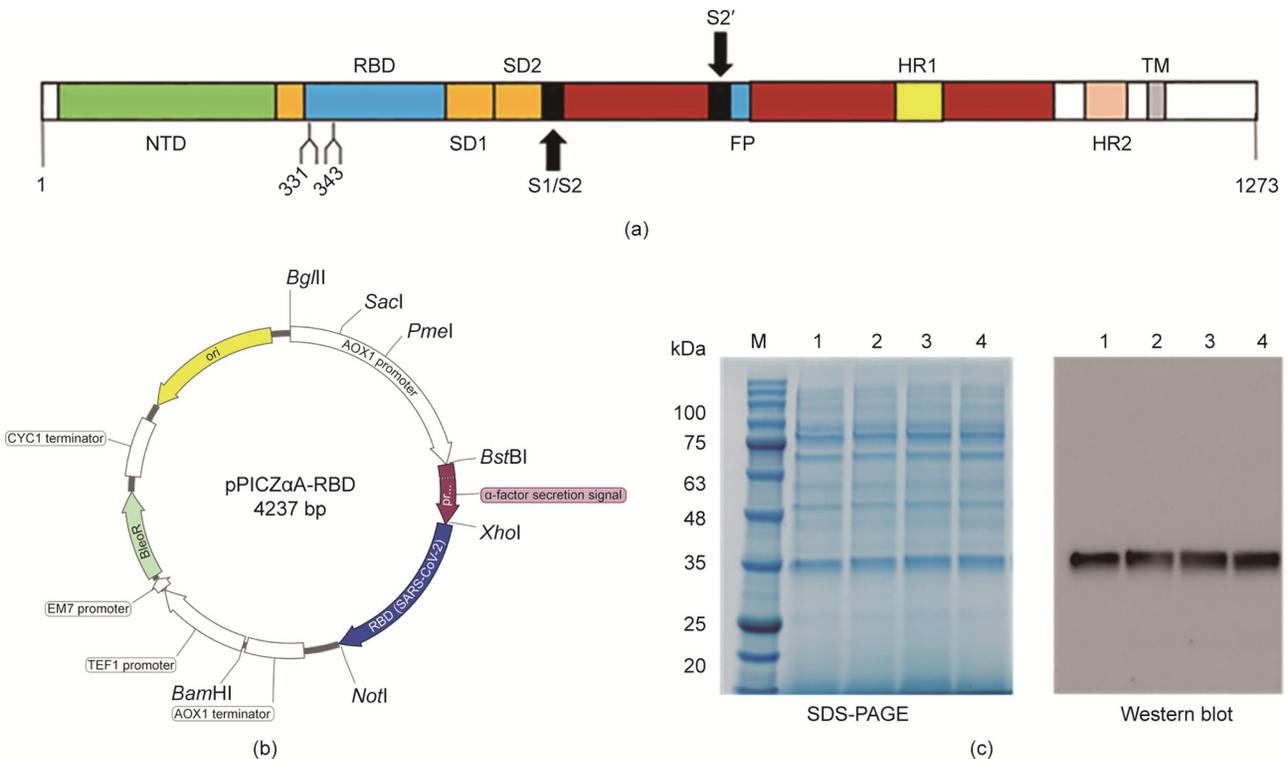


图 1. SARS-CoV-2 RBD 基因特征和蛋白表达。(a) SARS-CoV-2 S 蛋白序列示意图, 包含 *N* 端结构域 (NTD)、RBD、七肽重复序列 1 和 2 (HR1 和 HR2)、跨膜结构域 (TM)、亚结构域 1 和 2 (SD1 和 SD2)、融合肽 (FP)。N 糖基化位点 (氨基酸残基编号 331 和 343)。(b) pPICZ α A-RBD 质粒的图谱。(c) 各 Glycoeng-yeast/RBD 克隆的 SDS-PAGE 和 WB 印迹分析, 如泳道 1、2、3 和 4 所示。CYC1: 细胞色素 C1; EM7: 驱动大肠杆菌中的抗性基因 Zeocin 组成型表达的原核启动子; TEF1: 延伸因子 1; AOX1: 醇氧化酶启动子 1; BleoR: 博来霉素-R。

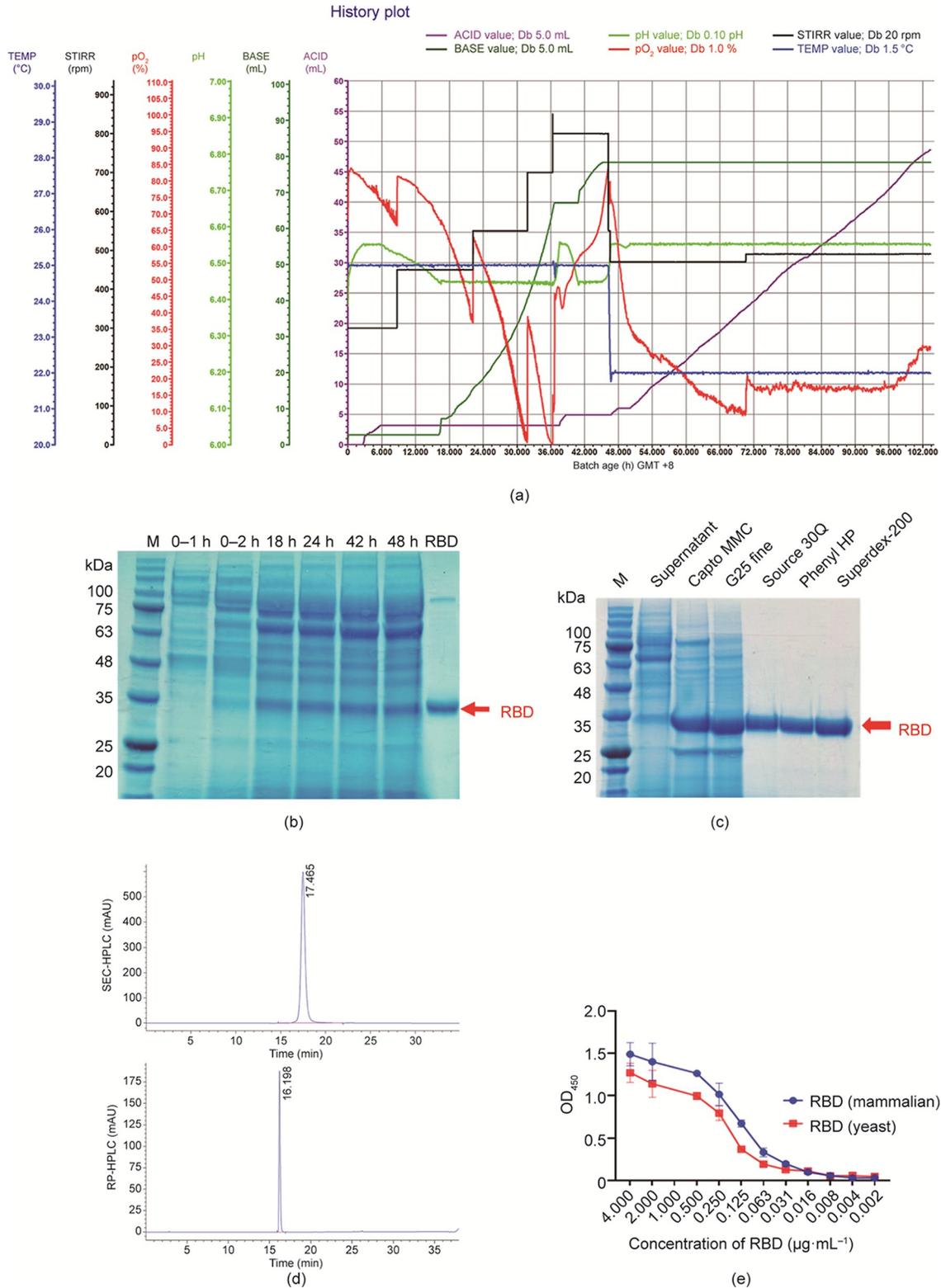


图2. yeast35/RBD 菌株发酵及RBD纯化步骤。(a) RBD蛋白的完整发酵过程图谱，显示搅拌速度 (STIRR; 黑色)、溶氧 (pO₂; 红色)、温度变化 (TEMP; 蓝色)、补碱量 (BASE; 深绿色)、pH (浅绿色) 和补酸量 (ACID; 紫色)。(b) 不同诱导时间RBD表达的SDS-PAGE分析。(c) RBD蛋白各步纯化SDS-PAGE。(d) 纯化RBD的SEC-HPLC和RP-HPLC。(e) 酵母细胞表达的RBD和哺乳动物细胞表达的RBD与人ACE2的结合能力。OD₄₅₀: 450 nm吸光度; AU: 吸光度单位。

离子交换柱、疏水层析、阴离子层析、阳离子层析和凝胶过滤层析，最终获得了高纯度的RBD蛋白，最终产率为

50 mg·L⁻¹。SDS-PAGE还原电泳分析证实，纯化的RBD蛋白为单一条带[图2 (c)]。SEC-HPLC (TSK gel

G2000SWXL, 5 μm , ϕ 7.8 mm \times 300 mm) 和 RP-HPLC (Agilent ZORBAX 300SB-C8, 5 μm , ϕ 4.6 mm \times 250 mm) 检测 RBD 为单一的对称尖峰, 说明 RBD 蛋白为高纯度完整蛋白[图 2 (d)]。通过 ELISA 检测酵母表达 RBD 和哺乳动物细胞表达 RBD 与 ACE2 的结合能力, 450 nm 的吸光度值结果表明二者无显著性差异 ($P = 0.5784$) [图 2 (e)]。

3.3. 重组 RBD 蛋白具有复杂型糖基化修饰

纯化得到的重组 RBD 蛋白的分子量 (30 kDa) 比理论值 (25 kDa) 高 25%, 利用 PNGase F 酶切 RBD 蛋白后, 分子量与理论分子量 (25 kDa) 一致[图 3 (a)], 表明 RBD 蛋白发生了 *N* 糖基化修饰。DSA-FACE 分析表明糖基工程酵母制备的 RBD 末端具有二天线半乳糖多糖 [图 3 (b)], 以牛核糖核酸酶 B 作为糖链标准, 该核糖核酸酶具有 5 种多糖结构 (Man₅GlcNAc₂ 至 Man₉GlcNAc₂ 或 M5~M9) [图 3 (b) 中的 I] [18]。利用 β 1,4-半乳糖苷酶、 β -*N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶和 α 1-2,3-甘露糖苷酶, 或利用 β 1,4-半乳糖苷酶、 β -*N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶混合酶切重组 RBD 蛋白糖型结构, β 1,4-半乳糖苷酶可切除 *N* 糖基化末端半乳糖, 使 Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ 变为 GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ [图 3 (b) 中的 IV]。 β -*N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶进一步切除 *N* 糖基化中 *N*-乙酰葡萄糖胺, 形成 Man₃GlcNAc₂ 结构 [图 3 (b) 中的 V]。 α 1-2,3-甘露糖苷酶酶切 Man₅GlcNAc₂ 结构形成 Man₂GlcNAc₂ 结构。以低甘露糖 (Man₅GlcNAc₂) 和复杂型糖链 (GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂) 为主进行酵母制备重组 RBD [图 3 (b) 中的 II]。其中中国仓鼠卵细胞表达的 RBD 具有双或三天线含岩藻糖复杂型 *N* 糖基化修饰, 且具有少量磷酸或非磷酸高甘露糖 (Man₅、Man₆) 修饰[19]。

3.4. RBD 特异性抗体分析

为了基于糖基工程酵母制备的 RBD 研制候选亚单位疫苗, 本研究选择了安全性和有效性良好的 Al(OH)₃ 作为佐剂。在制备疫苗的过程中加入 Al(OH)₃, 使蛋白疫苗吸附于铝凝胶沉淀, 并辅以 CpG(CpG2006)[13,20], 以双佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 以 PBS 作为对照组, 在每次免疫 14 d 后收集血清样本进行检测。

RBD 疫苗辅以 CpG 和 Al(OH)₃ 佐剂显著增加了抗体效价的免疫原性[图 4 (a)]。一免两周后, 检测到 RBD + Al(OH)₃ + CpG 实验小鼠组特异性抗体滴度为 7.4×10^4 , RBD + Al(OH)₃ 实验小鼠组未检测到特异性抗体的产生 (非配对 *t* 检验, $P < 0.0001$)。二免两周后, RBD + Al(OH)₃ + CpG 实验小鼠组抗体滴度为 6.8×10^6 , RBD + Al

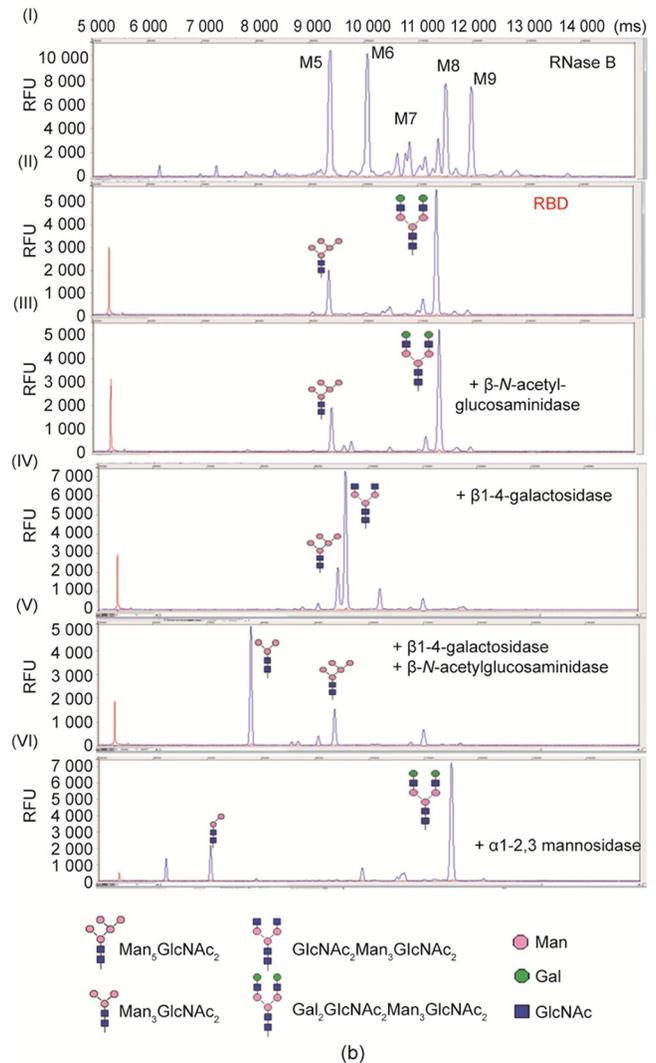
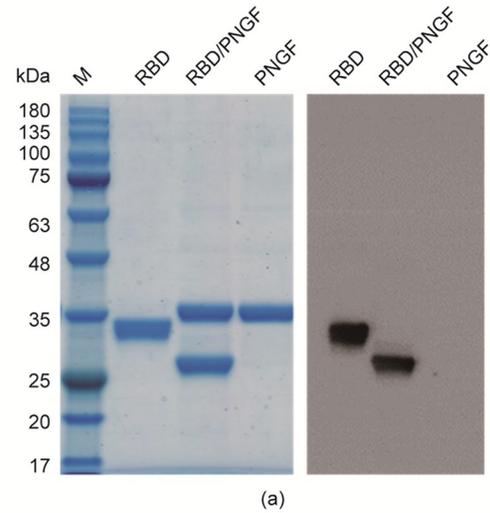


图 3. RBD 蛋白特性。(a) PNGase F 酶切 RBD 蛋白 SDS-PAGE 结果; (b) RBD 蛋白的 *N* 糖基化分析: (I) 牛 RNase B 蛋白糖型标准品 (Man₅GlcNAc₂–Man₉GlcNAc₂); (II) RBD 蛋白的 *N* 糖基化修饰; (III) β -*N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶酶切 RBD 蛋白糖型分析; (IV) β 1,4-半乳糖苷酶酶切 RBD 蛋白糖型分析; (V) β -*N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶和 β 1,4-半乳糖苷酶混合酶切 RBD 蛋白糖型分析; (VI) α 1-2,3-甘露糖苷酶酶切 RBD 蛋白糖型分析。PNGase F: 多肽 *N* 糖苷酶 F; RFU: 荧光单位。

(OH)₃组抗体滴度为 7.9×10^3 ($P < 0.0001$)。RBD + Al(OH)₃实验小鼠组因抗体滴度较低,进行了第三次免疫,三免两周后,RBD + Al(OH)₃实验小鼠组抗体滴度为 3.4×10^5 ,而未进行第三次免疫的RBD + Al(OH)₃ + CpG组(即二免四周)抗体滴度约为 4.5×10^6 ($P < 0.0001$)。结果表明RBD与CpG及Al(OH)₃双佐剂配伍效果优于RBD与Al(OH)₃单佐剂配伍。

之后检测了免疫后血清对SARS-CoV-2真病毒的中和活性[图4(b)]。一免两周后,RBD + Al(OH)₃ + CpG组和RBD + Al(OH)₃组病毒中和抗体滴度均在1:16以下,与阴性对照组基本相同。二免两周后,RBD + Al(OH)₃组病毒中和抗体滴度仍然在1:16以下,而RBD + Al(OH)₃ + CpG组病毒中和抗体滴度为1:1000 ($P < 0.05$),双佐剂组显著高于单佐剂组。RBD + Al(OH)₃组进行了第三次免

疫,三免两周后,中和抗体滴度为1:105,未进行第三次免疫的RBD + Al(OH)₃ + CpG组(二免四周)中和抗体滴度为1:1259 ($P < 0.05$),显著高于RBD + Al(OH)₃组。

为了确定RBD的最佳免疫剂量,进行了不同剂量RBD抗原免疫小鼠的实验。一免两周后,10 μg RBD组抗体滴度为 7.9×10^4 ,5 μg RBD组抗体滴度为 5.0×10^4 ,差异不显著 ($P = 0.1268$) [图4(c)]。2.5 μg RBD组抗体滴度为 5.0×10^4 ,与10 μg RBD组抗体滴度无显著性差异 ($P = 0.1268$)。二免两周后,10 μg RBD组抗体滴度为 3.2×10^6 ,5 μg RBD组抗体滴度为 2.5×10^6 ($P = 0.3739$),无显著性差异。2.5 μg RBD组抗体滴度为 1.0×10^6 ,显著低于10 μg RBD组抗体滴度 ($P < 0.05$) [图5(c)]。研究结果说明,在每剂50 μg Al(OH)₃和25 μg CpG条件下,对BALB/c小鼠进行10 μg和5 μg RBD抗原免疫后,诱发的

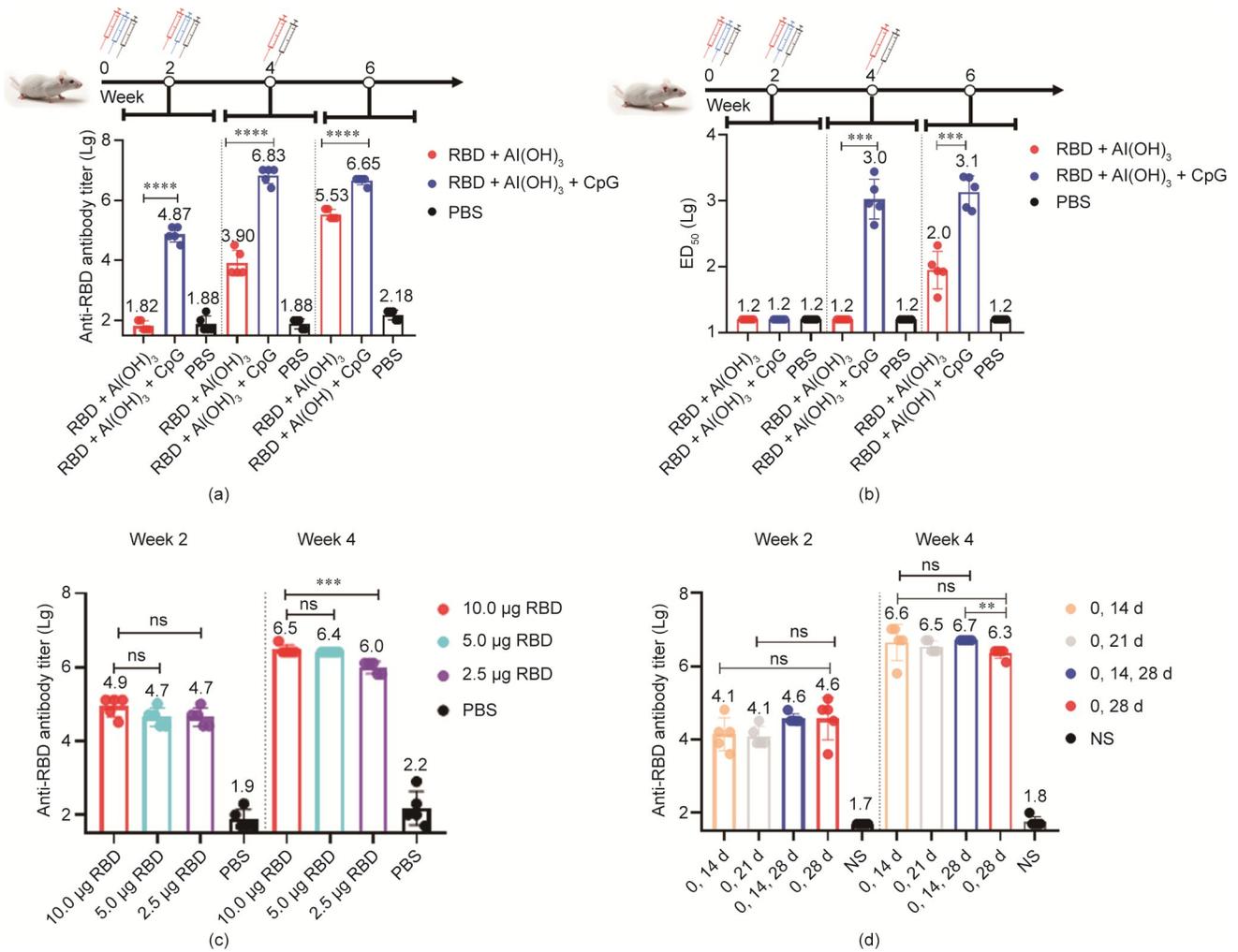


图4. 不同佐剂成分的疫苗对BALB/c小鼠的免疫作用。(a)不同佐剂成份疫苗接种后抗体滴度;RBD + Al(OH)₃ + CpG组未进行第三次免疫。(b)不同佐剂成分疫苗免疫后的抗体中和活性;RBD + Al(OH)₃ + CpG组未进行第三次免疫。(c)不同剂量RBD疫苗制剂[50 μg Al(OH)₃佐剂和25 μg的CpG]免疫后14天和28天诱发的抗体滴度(10.0 μg、5.0 μg和2.5 μg)。(d)不同免疫策略的RBD疫苗免疫14天后的抗体滴度[5 μg RBD与50 μg Al(OH)₃佐剂,25 μg CpG混合在100 μL体积中]。ns:无显著性差异;NS:生理盐水。*t*检验分析*p*值;ns: $p > 0.05$;**: $p < 0.01$;***: $p < 0.001$;****: $p < 0.0001$ 。

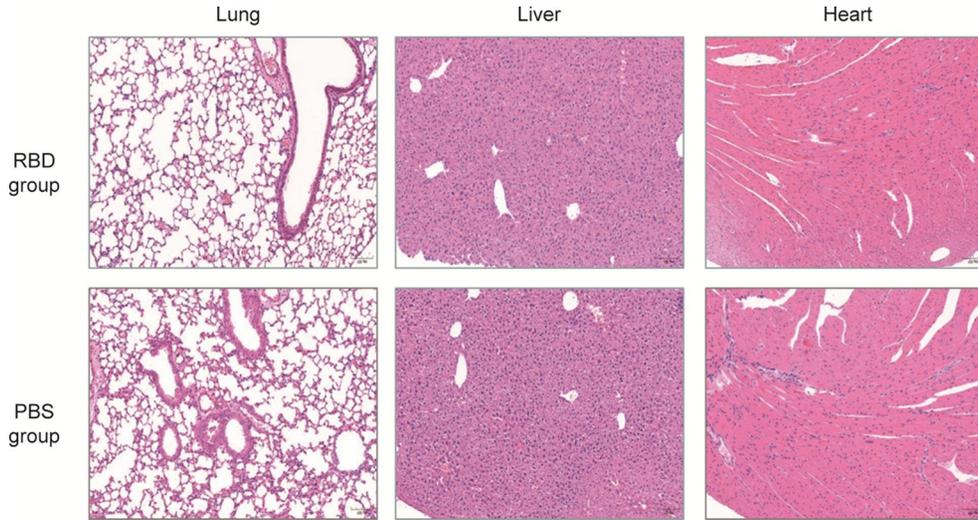


图5. 通过光学显微镜观察器官包括肝脏、肺和心脏组织（苏木素和伊红染色）的组织病理学变化。

抗体滴度无显著性差异，而2.5 μg RBD免疫效果略差。

为了确定最佳免疫策略，进行不同免疫时间点免疫BALB/c小鼠实验。一免两周后，各组抗体滴度无显著性差异。“0 d、14 d”组二免两周后，抗体滴度为 4.0×10^6 ；“0 d、21 d”组二免两周后，抗体滴度为 3.2×10^6 ；“0 d、14 d、28 d”组三免两周后，抗体滴度为 5.0×10^6 ；“0 d、28 d”组二免两周后，抗体滴度为 2.0×10^6 。统计学差异分析显示，“0 d、14 d、28 d”组抗体滴度显著高于“0 d、28 d”组 ($P < 0.05$)；其他各组间无显著性差异 [$P > 0.05$ ；图4 (d)]。说明免疫策略可采用“0 d、14 d”“0 d、21 d”“0 d、14 d、28 d”免疫。

3.5. 安全性评价

为了评估RBD候选疫苗的毒性，用光学显微镜观察肝脏、肺和心脏组织等主要器官的组织病理学变化。结果表明，试验组与对照组之间无明显差异（图5）。

3.6. RBD抗体反应的持久性

分别在免疫后第2周、4周、6周、14周、22周、26周从小鼠尾部采血，对抗体滴度的持久性进行测定。RBD + Al(OH)₃ + CpG组二免两周后抗体滴度为 6.3×10^6 ，免疫14周后抗体滴度为 3.2×10^6 ，两组抗体滴度无显著性差异 ($P = 0.0604$)。免疫22周后抗体滴度为 6.3×10^5 ，免疫26周后抗体滴度为 6.3×10^5 。RBD + Al(OH)₃组三免两周后抗体滴度为 3.2×10^5 ，免疫14周后抗体滴度为 6.3×10^5 ，两组抗体滴度无显著性差异 ($P = 0.1823$)。免疫22周后抗体滴度为 1.6×10^5 ，与三免两周后抗体滴度无显著性差异 ($P = 0.1878$)。免疫26周后抗体滴度为 2.5×10^4 [图6 (a)]。

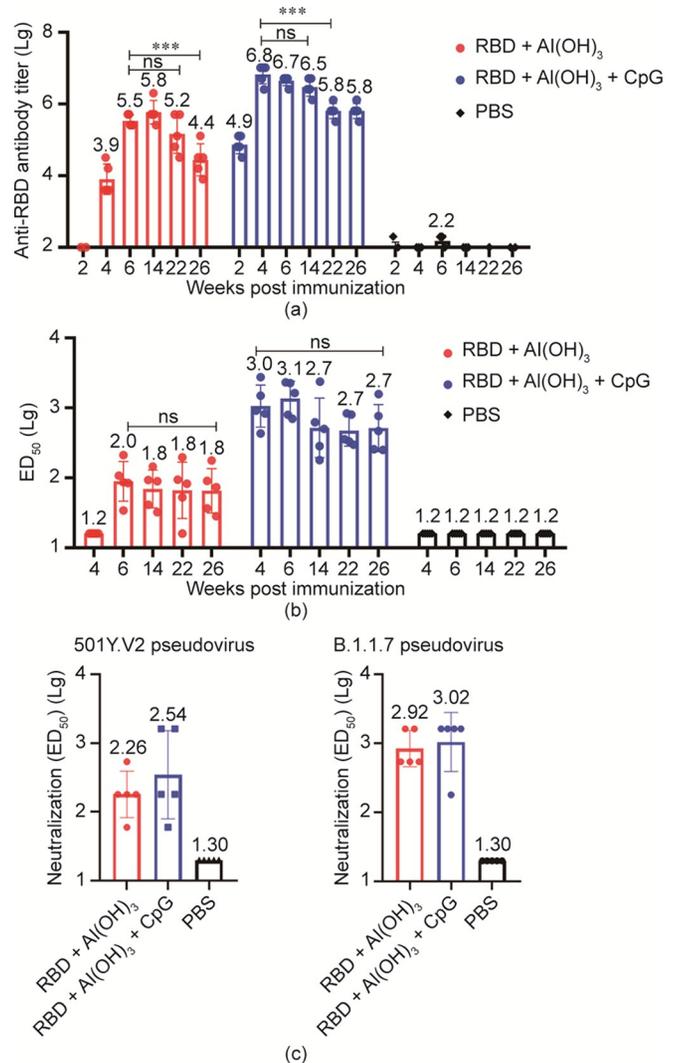


图6. 免疫后6个月内RBD抗体持久性检测。(a)不同佐剂成份RBD疫苗免疫后26周抗体滴度持续时间。(b)不同佐剂成份RBD疫苗免疫后26周针对SARS-CoV-2活病毒抗体中和活性持续时间。(c)针对SARS-CoV-2 501Y.V2和B.1.1.7假病毒抗体中和活性。ED₅₀: 中位有效剂量。*t*检验分析*p*值; ns: $p > 0.05$; ***: $p < 0.001$ 。

分别在免疫后第2周、4周、6周、14周、22周、26周对中和抗体滴度的持久性进行测定。RBD + Al(OH)₃ + CpG组二免两周后病毒中和抗体滴度为1:1000, 免疫26周后中和抗体滴度为1:501, 无显著性差异 ($P = 0.2218$)。RBD + Al(OH)₃组三免两周后抗体滴度为1:105, 免疫26周后抗体滴度为1:63, 无显著性差异 ($P = 0.5545$) [图6 (b)]。

RBD + Al(OH)₃组三免两周后针对501Y.V2假病毒的中和抗体滴度为1:182, 而RBD + Al(OH)₃ + CpG组同时时间点的中和抗体滴度为1:347。RBD + Al(OH)₃组三免两周后针对B.1.1.7假病毒的中和抗体滴度为1:832, 而RBD + Al(OH)₃ + CpG组同时时间点的中和抗体滴度为1:1047。因此, 本文研究数据表明, RBD疫苗免疫后血清对B.1.1.7和501Y.V2突变株具有交叉保护作用[图6 (c)]。

4. 讨论

与其他病毒的刺突蛋白一样, SARS-CoV-2的S蛋白表面被糖链覆盖, 有可能会遮蔽抗原表位以阻断宿主的免疫反应。S蛋白单体有22个N糖基化位点[21], 其中RBD区有N331和N343两个糖基化位点, 正确的糖基化修饰是免疫原性的重要保障。目前基于S蛋白的多条疫苗技术路线均以哺乳动物细胞或昆虫细胞作为培养基质, 目的均为确保蛋白发生正确的糖基化修饰。酵母作为一种低等真核生物具有N-糖基化修饰能力, 然而其糖链为过度甘露糖型。研究表明, 过度甘露糖基化修饰有可能会遮蔽抗原表位[22], 经过糖基化修饰途径并人源化改造的糖基工程酵母具备了哺乳动物N-糖基化修饰能力, 用其表达制备的H7N9流感病毒血凝素HA亚单位颗粒疫苗具有良好的免疫原性, 并能保护小鼠接受H7N9活病毒的攻击[11]。本研究利用糖基化修饰途径改造的巴斯德毕赤酵母作为宿主细胞, 表达制备SARS-CoV-2 S-RBD, 经DSA-FACE分析, SARS-CoV-2 S-RBD的N-糖基包含无岩藻糖侧链的复杂型糖基和低甘露糖型两种糖链, 保证了RBD抗原表位不会被遮蔽。

为了验证RBD候选疫苗的安全性, 本研究检测了RBD疫苗对小鼠的潜在毒性。结果未发现明显的副作用, 比如体重和行为的改变(数据没有显示)。在显微镜下检查肝脏、肺、心脏等器官无明显病理改变。

在本研究中, 观察到CpG与Al(OH)₃联合具有显著的佐剂效应; 在小鼠中, CpG联合Al(OH)₃能够诱导强大的针对RBD的体液和细胞免疫反应, 在长达26周的追踪中, 病毒中和抗体滴度没有明显降低。总之, 这些结果为

糖基工程酵母表达的RBD作为亚单位疫苗提供了免疫原性研究数据。更重要的是, 以糖基工程酵母为生产平台能够迅速应对病毒突变并容易扩大生产规模, 能在数周内完成候选疫苗的构建并建立稳定生产工艺。这些优势增加了RBD疫苗成为候选疫苗的成功率, 为控制新冠肺炎大流行做出重要贡献。如果CpG加Al(OH)₃佐剂作为新冠肺炎亚单位疫苗被证明是成功的, 那么基于糖基工程酵母的病毒糖蛋白的快速制备可能成为一种重要的新平台技术, 用于快速应对新出现的任何病毒。

致谢

本研究得到国家重点研发计划(2020YFC0841400-008)、国家科技重大专项(2018ZX09711003-013-002)、国家自然科学基金(81673339和81773619)项目的支持。

Compliance with ethics guidelines

Bo Liu, Ying Yin, Yuxiao Liu, Tiantian Wang, Peng Sun, Yangqin Ou, Xin Gong, Xuchen Hou, Jun Zhang, Hongguang Ren, Shiqiang Luo, Qian Ke, Yongming Yao, Junjie Xu, and Jun Wu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] www.who.int [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 [cited 2021 Jan 25]. Available from: <https://covid19.who.int/region/euro/country/tj>.
- [2] Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020; 581(7807):215–20.
- [3] Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, Dam KM, Esswein SR, Gristick HB, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature* 2020;588(7839):682–7.
- [4] Dai L, Zheng T, Xu K, Han Y, Xu L, Huang E, et al. A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell* 2020; 182(3):722–33.e11.
- [5] Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature* 2020;586(7830):572–7.
- [6] Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science* 2020;369(6501):330–3.
- [7] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24(1):45–66.
- [8] Dean N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* 1999;1426(2):309–22.
- [9] Wildt S, Gerngross TU. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(2):119–28.
- [10] Hamilton SR, Gerngross TU. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18(5):387–92.
- [11] Liu Bo, Shi P, Wang T, Zhao Y, Lu S, Li X, et al. Recombinant H7 hemagglutinin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* forms nanoparticles that protect mice from challenge with H7N9 influenza virus.

- Vaccine 2020;38(50):7938–48.
- [12] Thomson E, Rosen L, Shepherd J, Spreafico R, Filipe A, Wojcechowskyj J, et al. The circulating SARS-CoV-2 spike variant N439K maintains fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell* 2021;184(5):1171–87.
- [13] HogenEsch H, O’Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines* 2018; 3(1):51.
- [14] Shivahare R, Vishwakarma P, Parmar N, Yadav PK, Haq W, Srivastava M, et al. Combination of liposomal CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine induces strong cell-mediated immunity during experimental visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* 2014;9(4):e94596.
- [15] Pulendran B, Arunachalam PS., O’Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2021;20(6):454–75.
- [16] Choi B-K, Bobrowicz P, Davidson RC, Hamilton SR, Kung DH, Li H, et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize *N*-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5022–7.
- [17] Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B, Ballew N, et al. Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 2006;24 (2):210–5.
- [18] Callewaert N, Laroy W, Cadirgi H, Geysens S, Saelens X, Min Jou W, et al. Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1, 2- α -Dmannosidase for *N*-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* 2001; 503(2–3):173–8.
- [19] Gstöttner C, Zhang T, Resemann A, Ruben S, Pengelley S, Suckau D, et al. Structural and functional characterization of SARS-CoV-2 RBD domains produced in mammalian cells. *Anal Chem* 2021;93(17):6839–47.
- [20] Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MAL, Krieg AM, et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004;24(6):693–701.
- [21] Zhou D, Tian X, Qi R, Peng C, Zhang W. Identification of 22 *N*-glycosites on spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and accessible surface glycopeptide motifs: implications for vaccination and antibody therapeutics. *Glycobiology* 2021; 31(1):69–80.
- [22] Yang YL, Chang SH, Gong X, Wu J, Liu B. Expression, purification and characterization of low-glycosylation influenza neuraminidase in α -1, 6-mannosyltransferase defective *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep* 2012;39(2): 857–64.