

偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒制备及免疫原性评价

张越¹, 茹毅¹, 郝荣增¹, 杨洋¹, 赵陇和¹, 李亚军², 杨锐², 卢炳州¹, 郑海学^{1*}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学 动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000

2 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

张越, 茹毅, 郝荣增, 杨洋, 赵陇和, 李亚军, 杨锐, 卢炳州, 郑海学. 偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒制备及免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4509-4520.

ZHANG Yue, RU Yi, HAO Rongzeng, YANG Yang, ZHAO Longhe, LI Yajun, YANG Rui, LU Bingzhou, ZHENG Haixue. Preparation and immunogenicity evaluation of ferritin nanoparticles conjugated with African swine fever virus p30 protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4509-4520.

摘要: 本研究旨在利用铁蛋白制备携带非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的纳米颗粒抗原, 并对其免疫原性进行评价, 为非洲猪瘟纳米疫苗研究提供实验基础。首先, 将编码 p30 蛋白和 SpyTag 标签的基因序列融合后插入 pCold-I 载体, 得到 pCold-p30 质粒。将编码 SpyCatcher 与铁蛋白的基因序列融合后插入 pET-28a(+)载体得到 pET-F-np 质粒, 并分别在大肠杆菌中诱导表达。然后, 将亲和层析纯化后的 p30 蛋白与铁蛋白在体外偶联结合, 用分子筛纯化后得到偶联 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒 F-p30, 利用粒径仪、透射电镜观察形态结构。将 F-p30 纳米颗粒蛋白免疫小鼠, 评估其体液和细胞免疫应答。结果表明, 本研究成功制备出偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒, 颗粒结构约 20 nm。F-p30 在体外能被小鼠骨髓源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)高效摄取, 与 p30 蛋白相比, F-p30 纳米颗粒免疫小鼠诱导产生更高水平的特异性抗体和细胞因子, 更有利于刺激淋巴结滤泡辅助 T 细胞(follicular helper T cell, T_{FH})、生发中心 B 细胞(germinal center B cell, GCB)和脾脏 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖。综上, 本研究成功制备了偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒, 能显著增强 p30 蛋白的免疫原性, 为非洲猪瘟疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 非洲猪瘟; p30 蛋白; 铁蛋白纳米颗粒; 免疫原性

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801302-3); 甘肃省自然科学基金重点项目(23YFNA0011); 中央高校基本科研业务费专项(lzujbky-2022-ct02); 兰州市青年科技人才创新项目(2023-QN-3); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CAAS-ZDRW202409); 国家生猪产业技术体系(CARS-35); 甘肃省科技重大专项(23ZDKA0002)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801302-3), the Natural Science Foundation Key Project of Gansu Province (23YFNA0011), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (lzujbky-2022-ct02), the Youth Science and Technology Talent Innovation Program of Lanzhou (2023-QN-3), the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (CAAS-ZDRW202409), the Earmarked Fund for National Pig Industry Technology System (CARS-35) and the Science and Technology Department of Gansu Province (23ZDKA0002).

*Corresponding author. E-mail: zhenghaixue@caas.cn

Received: 2024-04-28; Accepted: 2024-07-10; Published online: 2024-07-11

Preparation and immunogenicity evaluation of ferritin nanoparticles conjugated with African swine fever virus p30 protein

ZHANG Yue¹, RU Yi¹, HAO Rongzeng¹, YANG Yang¹, ZHAO Longhe¹, LI Yajun², YANG Rui², LU Bingzhou¹, ZHENG Haixue^{1*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: This study developed ferritin-based nanoparticles carrying the African swine fever virus (ASFV) p30 protein and evaluated their immunogenicity, aiming to provide an experimental basis for the research on nanoparticle vaccines against ASFV. Initially, the gene sequences encoding the p30 protein and SpyTag were fused and inserted into the pCold-I vector to create the pCold-p30 plasmid. The gene sequences encoding SpyCatcher and ferritin were fused and then inserted into the pET-28a(+) vector to produce the pET-F-np plasmid. Both plasmids were expressed in *Escherichia coli* upon induction. Subsequently, the affinity chromatography-purified p30 protein was conjugated with ferritin *in vitro*, and the p30-ferritin (F-p30) nanoparticles were purified by size-exclusion chromatography. The morphology and structural integrity of F-p30 nanoparticles were examined by a particle size analyzer and transmission electron microscopy. Mice were immunized with F-p30 nanoparticles, and the humoral and cellular immune responses were assessed. The results showed that F-p30 nanoparticles were successfully prepared, with the particle size of approximately 20 nm. F-p30 nanoparticles were efficiently internalized by bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) cells *in vitro*. Compared with the p30 protein alone, F-p30 nanoparticles induced elevated levels of specific antibodies and cytokines in mice and stimulated the proliferation of follicular helper T cell (T_{FH}) and germinal center B cell (GCB) in lymph nodes as well as CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen. In conclusion, we successfully prepared F-p30 nanoparticles which significantly enhanced the immunogenicity of p30 protein, giving insights into the development of vaccines against ASFV.

Keywords: African swine fever; p30 protein; ferritin nanoparticles; immunogenicity evaluation

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种急性接触性传染病,可引起家猪和野猪在临床出现急性出血热,致死率可达 100%^[1],被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)列为 A 类法定传染病,在我国被列为一类动物疫病。非洲猪瘟病毒是目前已知唯一虫媒 DNA

病毒,基因组大小在 170–194 kb 之间,编码超过 150 种蛋白质^[2],病毒粒子为直径约 250 nm 的正二十面体,由 5 层结构组成,由内到外依次为:类核,核壳,内囊膜,病毒衣壳,外囊膜^[3]。非洲猪瘟病毒的结构复杂、基因组庞大、流行毒株变异快,目前仍然没有商品化疫苗上市,因此疫苗研究工作十分必要。

基因工程亚单位疫苗是包含病原体的一种或多种抗原成分的疫苗,具有安全性高、易于扩大生产等优点^[4]。然而,亚单位疫苗免疫原性通常低于病毒全组分疫苗,需要借助佐剂或纳米载体来增强疫苗的免疫效果^[5]。由于纳米尺寸的抗原与病毒粒子大小接近,更容易被巨噬细胞和树突状细胞捕获,所以抗原递呈细胞对纳米颗粒抗原的识别和提呈效率更高^[6-7]。因此,将抗原正确地展示在纳米材料表面,可以提高或改善抗原的免疫原性,纳米颗粒疫苗也是当前新型疫苗研发的主要方向之一^[8-9]。

其中“即插即用”的 SpyTag/SpyCatcher 结合系统是利用化脓链球菌的纤维结合蛋白(fibronectin-binding protein, FbaB)开发的^[10-14],将该蛋白的胶原黏连蛋白结构域拆分为 138 个氨基酸的 SpyCatcher (反应位点 31 位的 Lys)和 13 个氨基酸的 SpyTag (反应位点 117 位的 Asp),两部分在溶液中可自发形成稳定的肽键。在设计过程中将 SpyCatcher 与颗粒融合表达使结合位点暴露,将抗原与 SpyTag 融合表达,两者混合反应就可将抗原偶联在颗粒结构的表面,避免了颗粒蛋白与抗原蛋白直接融合表达而产生空间位阻影响颗粒的组装及稳定性,也降低了蛋白质表达的难度^[15]。2021 年, Kang 等^[16]利用该系统将新型冠状病毒的受体结合域(receptor-binding domain, RBD)展示在 3 种组装纳米颗粒的表面,免疫小鼠后诱导产生的中和抗体是单体 RBD 蛋白的 8-120 倍,显著提升了抗原的免疫原性。

非洲猪瘟亚单位疫苗能够提供一定的免疫保护效果^[17],其中 p30 蛋白是 ASFV 中抗原性最强的蛋白质之一,是由 CP204 基因编码的相对分子量 30 kDa 左右的内囊膜蛋白。该蛋白在病毒感染后早期出现,并在整个感染周期持续表达,使得感染动物产生中和抗体,也是病毒

内化到宿主细胞的必需蛋白质,已有研究证明该蛋白是一种重要的保护性抗原^[18-19],其抗体能够抑制病毒粒子内化^[18]。但单独的 p30 蛋白并不能产生很好的免疫保护效果,本研究利用自组装纳米颗粒递送非洲猪瘟 p30 蛋白,以期提高抗原免疫原性^[20],而铁蛋白纳米颗粒是由 24 个亚基组成的空心结构,每个亚基的 N 端都暴露在球形结构的外表面,可用于展示抗原蛋白。铁蛋白纳米颗粒具有高度的稳定性、良好的生物相容性和独特的自组装能力,是一种理想的抗原递呈和疫苗开发平台^[21-25]。

本研究制备偶联 ASFV p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒,进行动物免疫实验并检测其免疫原性,以期为非洲猪瘟纳米颗粒疫苗的开发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌表达感受态 BL21(DE3)购自北京索莱宝科技有限公司;鼠源 His 单抗、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠和山羊抗猪 IgG 抗体均购自 Abcam 公司;rmGM-CSF、rmIL-4 均购自 Pepro Tech 公司;FITC 偶联试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;小鼠淋巴细胞分离液 DKW33-R0100 购自达科为生物技术股份有限公司;流式细胞术检测用抗体购自杭州联科生物技术股份有限公司;LEGENDplex 多细胞因子检测试剂盒购自 BioLegend 生物公司;Ni-NTA 亲和层析柱购自金斯瑞生物科技股份有限公司;Capto Core 700 凝胶过滤柱和 AKTA Pure150 蛋白纯化仪均购自 Cytiva 公司;透射电镜 HT7700 购自日立公司;马尔文粒径仪 ZEN3700 购自马尔文帕纳科公司;激光共聚焦显微镜购自莱卡公司;Balb/c 小鼠购自中国农

业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 颗粒蛋白和偶联抗原的设计与合成

颗粒的设计: 由于 Ferritin N 端暴露在颗粒的表面, 本研究将 SpyChacer 融合在 Ferritin N 端, 选择 *Nde* I 和 *Xho* I 作为酶切位点, 并将目的基因插入至 pET-28a(+) 质粒, 得到 pET-F-np 重组质粒。

抗原的设计: 将 SpyTag 融合在 p30 的 C 端, 选择 *Eco*R I 和 *Xho* I 作为酶切位点, 并将目的基因插入到 pCold-I 质粒, 得到 pCold-p30 重组质粒。设计模式图见图 1, 质粒由苏州金唯智生物科技有限公司合成并测序。

1.2.2 铁颗粒蛋白及颗粒抗原的制备

将重组表达质粒 pET-F-np 和 pCold-p30 分别转化到 BL21(DE3) 感受态细胞后挑选阳性单克隆菌落至 10 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中扩大培养, 再以 1:100 比例接种到 1 L 的液体 LB 培养基中。当菌液 OD_{600} 达到 0.8 时, 添加异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导过夜。4 000 r/min 离心 30 min 收集菌体。用平衡缓冲溶液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬菌体, 超声破碎, 收集高速离心后的上清, 利用镍亲和层析柱纯化目标蛋白。经 SDS-PAGE 鉴定纯化后的目标蛋白, 并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

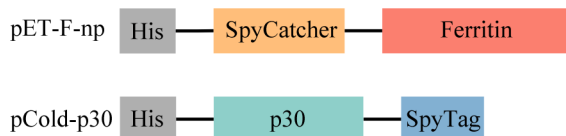


图 1 质粒设计模式图

Figure 1 Diagram of two plasmids design patterns.

偶联 p30 蛋白的铁纳米颗粒(F-p30 蛋白)制备: 将 p30 蛋白与铁蛋白(F-np)在结合液 (50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。为去除未缀合的 p30 蛋白, 将蛋白混合液通过结合液预平衡的 Capto Core 700 凝胶过滤柱, 收集对应流穿液, 经 SDS-PAGE 鉴定纯化后的目标蛋白。

1.2.3 重组蛋白免疫原性分析

将 p30 重组蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 分离, 再电转至硝酸纤维素膜上 (400 mA, 1.5 h), 分别以小鼠 His 标签单抗和猪源 ASFV 阳性血清为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠和山羊抗猪 IgG 为二抗, 对重组蛋白 p30 进行 Western blotting 分析, 用 ECL 化学发光液对底物进行显色, 并用高分辨凝胶成像系统拍照。

1.2.4 颗粒结构的表征

透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM): 将 F-p30 蛋白浓度稀释至 0.2 mg/mL, 滴加到新的 200 目的普通碳支持膜上 2 min, 并用滤纸吸干; 再用 2% 磷钨酸染色 10 s, 用滤纸吸干, 待风干后使用透射电子显微镜中对栅格进行成像。

动态光散射 (dynamic light scattering, DLS): 进行 DLS 分析以表征蛋白质形成的纳米颗粒, 将纯化的蛋白质在 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min 以去除聚集体, 用 PBS 稀释至 0.5 mg/mL, 并装入一次性比色皿中。按照马尔文粒径仪操作手册在 25 $^{\circ}$ C 测量蛋白质样品的粒径尺寸。

1.2.5 BMDC 对颗粒 p30 的吞噬摄取

按照 FITC 偶联试剂盒的说明书将 p30 和 F-p30 蛋白用 FITC 进行标记, 分离小鼠的骨髓细胞, 并使用 RPMI 1640 培养基 (含 10% 胎牛血清、20 ng/mL rmGM-CSF、10 ng/mL rmIL-4) 进行培养, 每隔 2 d 换液, 培养 7 d 成熟后收集, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释后铺到共聚焦小皿。37 $^{\circ}$ C 培养过夜后将标记的

p30 及 F-p30 及未标记的 p30 蛋白(Mock 组)稀释至相同的摩尔浓度(100 $\mu\text{mol/L}$), 然后分别添加 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。加入溶酶体红色荧光探针至终浓度 50 nmol/L , 孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 3–5 次, 利用激光共聚焦显微镜观察 BMDC 细胞摄取不同标记蛋白质的差异。

1.2.6 免疫小鼠

调整 p30、F-np、F-p30 蛋白的浓度均为 10 mmol/L , 按照抗原与佐剂 1:1 的比例进行乳化, 取 Balb/c 小鼠 20 只, 分为 PBS、p30、F-np、F-p30 组, 每组 5 只小鼠, 各组按照与 p30 组免疫用蛋白等摩尔的量^[6]进行免疫, 其中 p30 组免疫 1 μmol 即 30 $\mu\text{g/只}$, F-np (37.5 $\mu\text{g/只}$)、F-p30 (67.5 $\mu\text{g/只}$)、PBS 组按照等体积(100 μL)的 PBS 与弗氏佐剂乳化, 一免利用弗氏完全佐剂, 间隔 2 周进行加强免疫(利用弗氏不完全佐剂乳化)。本研究中涉及的动物实验获得了中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(批准号: LVRIAEC-2023-082)。

1.2.7 血清抗体滴度

将 p30 蛋白稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$, 按 100 $\mu\text{L/孔}$ 加入酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜结合。用 PBST 洗板后每孔加入 200 μL 封闭液, 室温封闭 2 h 后弃掉封闭液, 用 PBST 洗板 3 次。将检测小鼠血清进行 1:1 000 稀释后, 再进行 2 倍系列稀释(1:1 000–1:128 000), 每孔加入 100 μL 稀释后的血清。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后, 用 PBST 洗板 4–5 次。每孔加入 100 μL HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱反应 1 h 后, 用 PBST 洗板 5 次, 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 室温避光显色 5–10 min, 每孔加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止显色。利用酶标仪读取各孔的 OD_{450} 的数值。

1.2.8 流式细胞术

加强免疫 2 周后分离小鼠淋巴结和脾脏, 利用流式细胞术检测淋巴结 T_{FH} 和 GCB 以及脾脏活化 T 细胞比例的变化。利用 2 mL 注射器活塞将组织研磨到 RPMI 1640 培养基中得到细

胞悬浮液, 细胞悬浮液通过 40 μm 尼龙网过滤, 用培养基洗涤细胞, 淋巴结悬液用 40% Percoll 细胞分离液去除脂肪收集细胞沉淀。加入红细胞裂解液并用 PBS 洗涤。淋巴结细胞悬液检测使用 Anti-CD4 FITC、Anti-PD-1 PE、Anti-CXCR5 APC、Anti-CD19 FITC、Anti-GL7 APC 和 Anti-CD95 PE 抗体。脾脏悬液检测使用 CD3-FITC、CD4-APC、CD8-PE。标记后的样品荧光信号记录在流式细胞仪上分析流式细胞仪, 实验结果用 FlowJo 软件分析。 T_{FH} 检测用 Anti-CD4 FITC、Anti-PD-1 PE、Anti-CXCR5 APC 标记, GCB 检测用 Anti-CD19 FITC、Anti-GL7 APC、Anti-CD95 PE 标记。

1.2.9 细胞因子检测

加强免疫 14 d 后分离小鼠脾脏淋巴细胞, 用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基稀释为 10^6 个细胞/mL, 6 孔板每孔 1 mL, 每孔加入 10 μg p30 蛋白, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 60 h, 收集细胞上清, 利用多细胞因子检测试剂盒检测 IFN- γ 、IL-10、IL-12 的含量。

1.2.10 统计学分析

所有数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 GraphPad Prism 9.0 进行单因素方差分析。ns: $P > 0.05$, 表示各组间无统计学差异; *: $P < 0.05$, 表示各组间有统计学差异; **: $P < 0.01$, 表示各组间有显著性统计学差异; ***: $P < 0.001$, 表示各组间有极显著性统计学差异。

2 结果与分析

2.1 重组质粒在大肠杆菌中的表达及重组蛋白纯化

将重组质粒 pET-F-np 和 pCold-p30 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 低温诱导后收集菌液, 收集破碎高速离心后的上清, 利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后, 成功得到重组蛋白 F-np 和 p30, 分子量大小分别为 37 kDa 和 30 kDa (图 2), 与预期相符且纯度较好。

2.2 重组蛋白 p30 反应原性分析

将 p30 重组蛋白进行 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜, 分别用鼠源 His 标签抗体和 ASFV 猪阳性血清为一抗进行 Western blotting 分析, 结果显示在 30 kDa 处有明显的识别条带(图 3), 表明融合蛋白具有良好的反应活性。

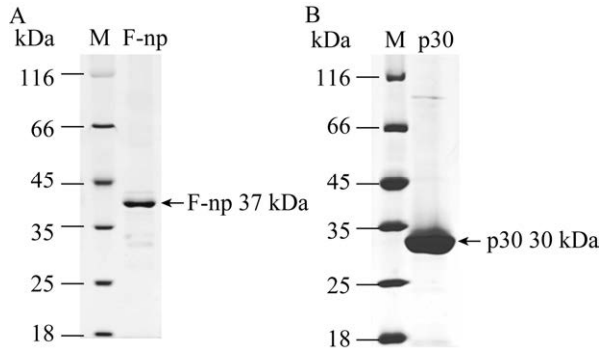


图 2 重组蛋白质纯化后的 SDS-PAGE 分析
A: F-np 蛋白质纯化结果. B: p30 蛋白质纯化结果
Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins after purification. A: Purification results of F-np protein. B: p30 protein purification results. M: Protein marker.

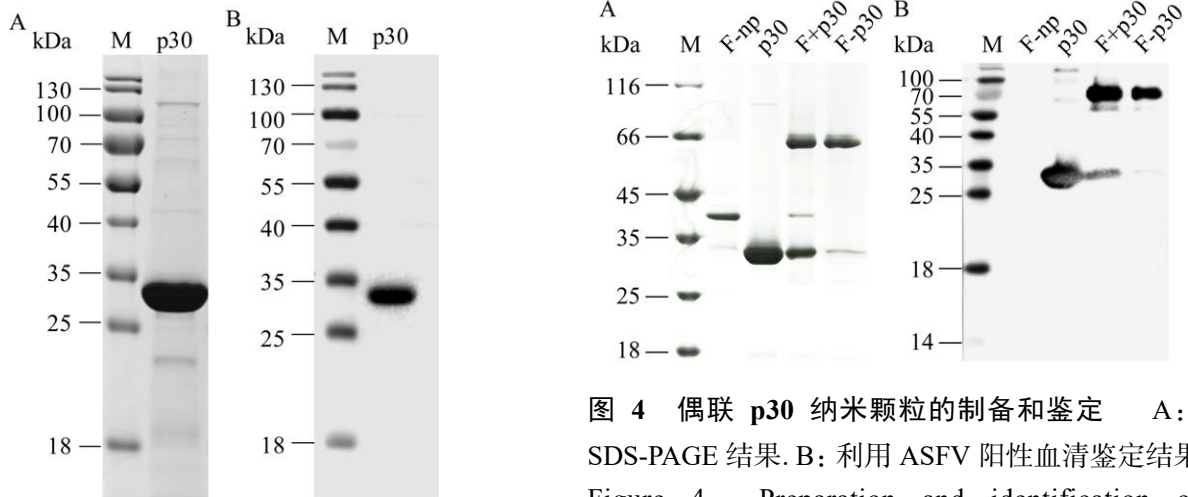


图 3 p30 蛋白的反应原性鉴定 A: 利用 His 标签抗体的鉴定结果. B: 利用 ASFV 阳性血清的鉴定结果

Figure 3 Immunogenicity identification of p30 protein. A: Mouse anti-His tagged antibody against p30. B: Pig anti-ASFV serum against p30. M: Protein marker.

2.3 偶联 p30 蛋白纳米颗粒的制备

将纯化得到的 p30 蛋白与铁颗粒蛋白混合, 在 4 °C 摇床孵育过夜偶联, 通过 Capto Core 700 分子筛纯化柱, 以去除多余未偶联的 p30 蛋白质。利用 ASFV 阳性血清进行 Western blotting 分析, 证明成功制备了偶联 p30 蛋白的纳米颗粒 F-p30 (图 4)。

2.4 F-p30 纳米颗粒的结构表征

利用透射电镜观察 F-p30 纳米颗粒, 能够明显看到颗粒结构, 使用粒径仪检测也显示 p30 蛋白与铁蛋白偶联后纳米颗粒的尺寸增加(图 5), 表明获得了偶联非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的铁蛋白纳米颗粒, 颗粒大小约为 20 nm。

2.5 F-p30 纳米颗粒可被 BMDC 高效摄取

FITC 偶联的 p30 蛋白和 F-p30 纳米颗粒分别与 BMDC 孵育后, 结果显示 F-p30 纳米颗粒蛋白能被 BMDC 细胞快速摄取, 而单纯的 p30 蛋白几乎没有摄取(图 6)。

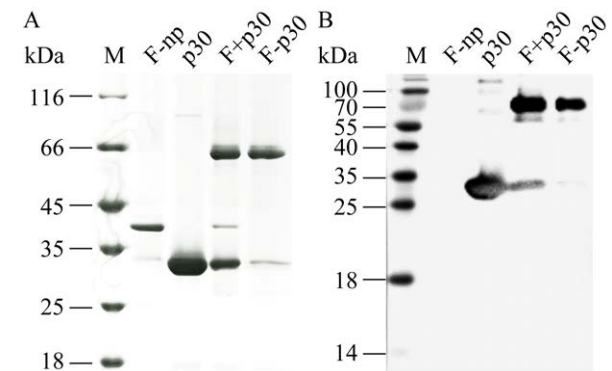


图 4 偶联 p30 纳米颗粒的制备和鉴定 A: SDS-PAGE 结果. B: 利用 ASFV 阳性血清鉴定结果
Figure 4 Preparation and identification of conjugated nanoparticles. A: SDS-PAGE results of conjugated nanoparticles. B: ASFV-positive serum identification results. M: Protein marker; F-np: Purified F-np protein; p30: Purified p30 protein; F+p30: Sample of F-np protein coupled to p30 protein overnight at 4 °C; F-p30: The F-np protein was coupled to the p30 protein at 4 °C overnight using molecular sieve purified samples.

2.6 F-p30 纳米颗粒刺激产生更强的体液免疫

检测加强免疫后 2 周的血清发现, F-p30 颗粒免疫后产生 p30 蛋白的特异性抗体水平更高(图 7A)。对血清中特异性各类抗体亚类的检测发现 F-p30 蛋白免疫后小鼠血清中的 IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgM 的含量都更高(图 7B), 这些结果表

明 F-p30 纳米颗粒能刺激更强的体液免疫。

2.7 F-p30 纳米颗粒增强淋巴结的免疫激活

将加强免疫的小鼠的淋巴结取出, 制备成细胞悬液, 检测发现 F-p30 纳米颗粒免疫产生 T_{FH} 和 GCB 比例都明显升高(图 8), 与 p30 蛋白免疫组相比差异显著($P<0.01$)。这些结果表明 F-p30 颗粒能增强淋巴结的免疫激活。

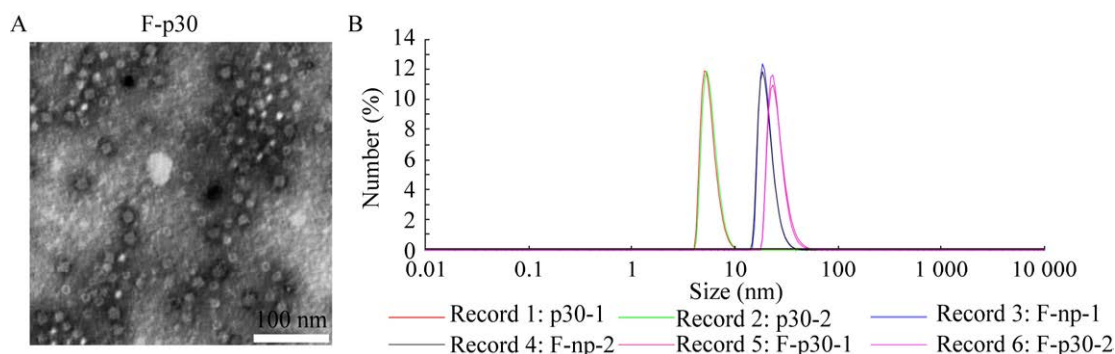


图 5 p30 纳米颗粒的表征 A: 透射电镜观察结果. B: 粒径仪检测结果

Figure 5 Characterization of p30 nanoparticles. A: Transmission electron microscopy of F-p30. Scale bar=100 nm. B: p30 nanoparticle size detection.

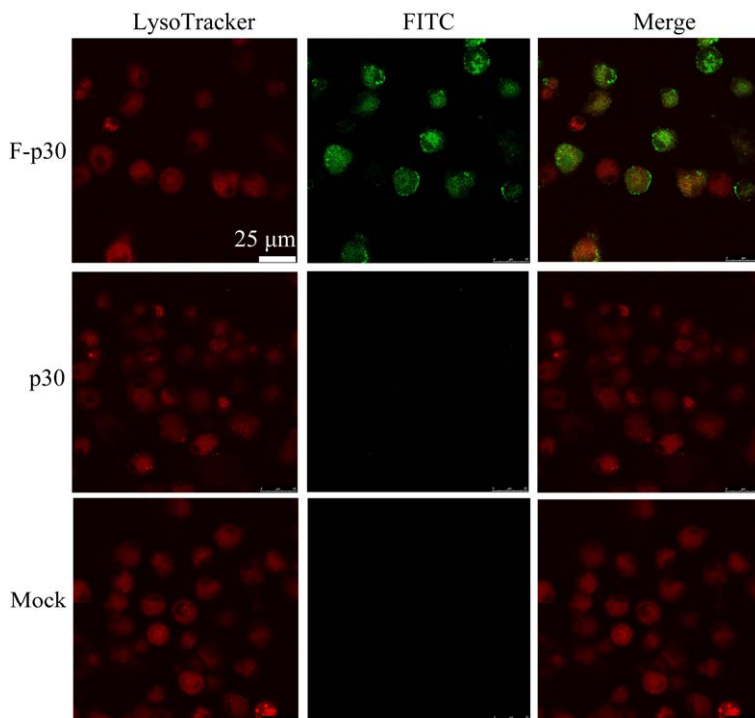


图 6 BMDC 对 p30 纳米颗粒的摄取

Figure 6 Uptake of p30 nanoparticles by BMDC. p30 protein and FITC-conjugated p30 protein and p30 nanoparticles were incubated with BMDC for 2 h and then FITC (green) and LysoTracker (red) were observed with confocal microscopy. Scale bar=25 μ m.

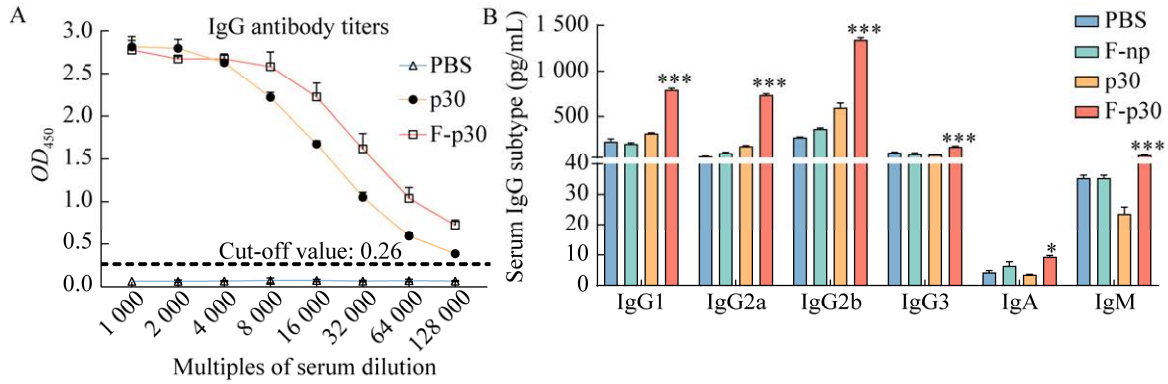


图7 加强免疫后血清抗体分析

A: 二免2周血清的p30蛋白特异性抗体滴度. B: 二免2周后血清中不同抗体的含量

Figure 7 Serum antibody analysis after booster immunization. A: p30-specific antibody titers in serum for two weeks of booster immunization. B: The levels of different antibodies in serum for two weeks of booster immunization. The results are expressed as $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$ (statistical difference); ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

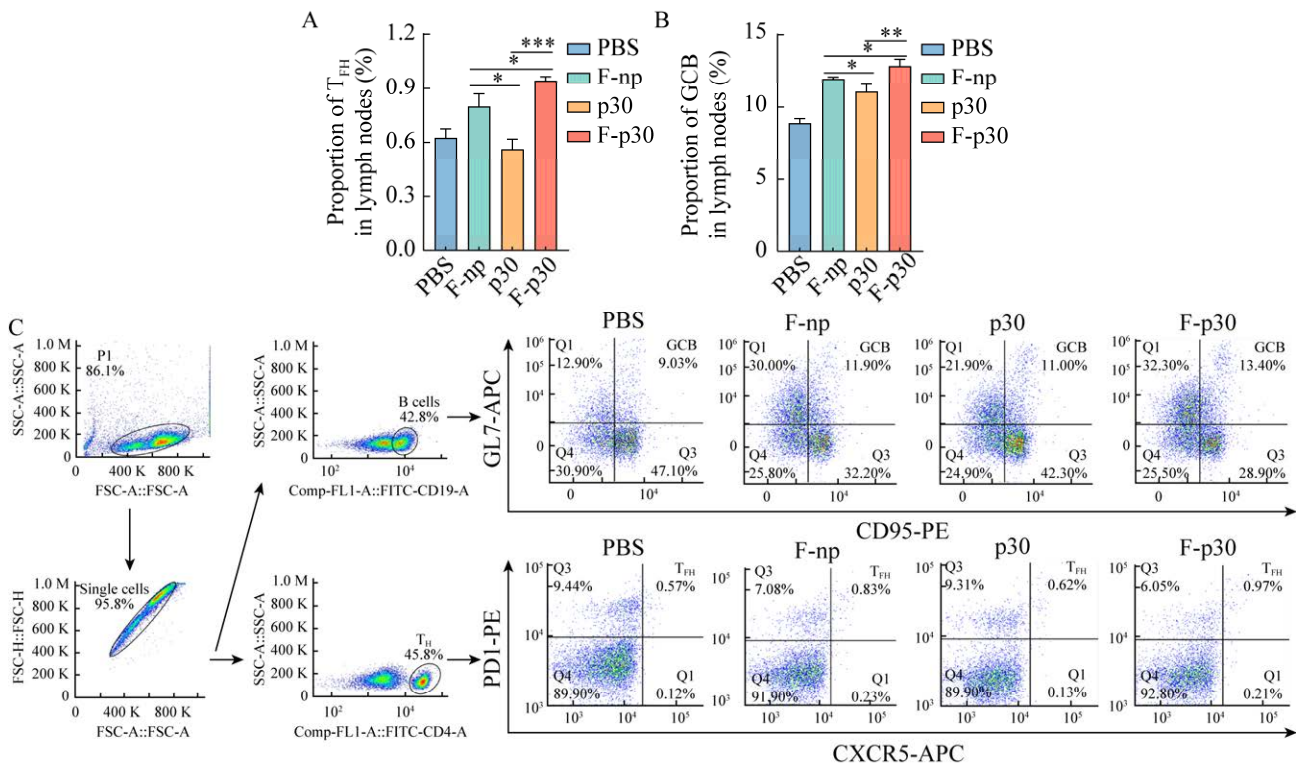


图8 淋巴结 T_{FH} (CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺) (A)和淋巴结 GCB (CD19⁺ CD95⁺ GL7⁺) (B)的比例及对应的流式检测散点图(C)

Figure 8 Changes of immune cells in lymph nodes. Proportion of T_{FH} (CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺) (A) and proportion of GCB (CD19⁺ CD95⁺ GL7⁺) in lymph nodes (B). C: A scatter plot of the lymph node T_{FH} and GCB flow assay. The results are expressed as $\bar{x} \pm s$. *: $P < 0.05$ (statistical difference); **: $P < 0.01$ (significant difference); ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

2.8 F-p30 纳米颗粒提升细胞免疫水平

通过流式细胞术检测脾脏 T 淋巴细胞的变化, 结果表明 F-p30 纳米颗粒免疫产生 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例明显升高(图 9), 与 p30 蛋白免疫组相比统计学差异极显著($P < 0.001$), 表明 F-p30 颗粒能诱导产生更强的细胞免疫应答。

2.9 F-p30 纳米颗粒免疫能刺激产生更强的细胞因子

用 p30 蛋白刺激不同免疫组的脾淋巴细胞, 结果显示 F-p30 纳米颗粒免疫能刺激产生更高水平的细胞因子(图 10), 能更好地诱导机体免疫应答。

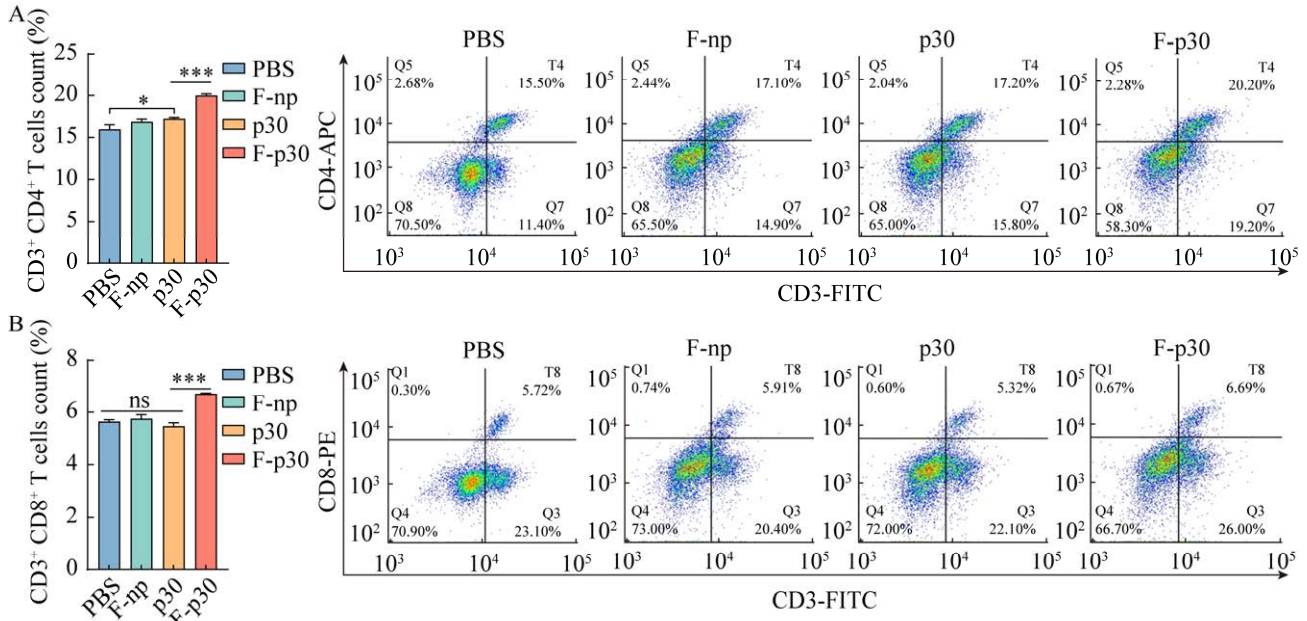


图 9 脾脏 T 淋巴细胞的比例 A: 脾脏中 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例及流式检测散点图. B: 脾脏中 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例及流式检测散点图

Figure 9 Proportion of T lymphocytes in the spleen. A: Proportion of CD4⁺ T lymphocytes in the spleen and scatter plot of flow cytometry. B: The proportion of CD8⁺ T lymphocytes in the spleen and the scatter plot of flow cytometry. The results are expressed as $\bar{x} \pm s$. ns: $P > 0.05$ (no obvious difference); *: $P < 0.05$ (statistical difference); ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

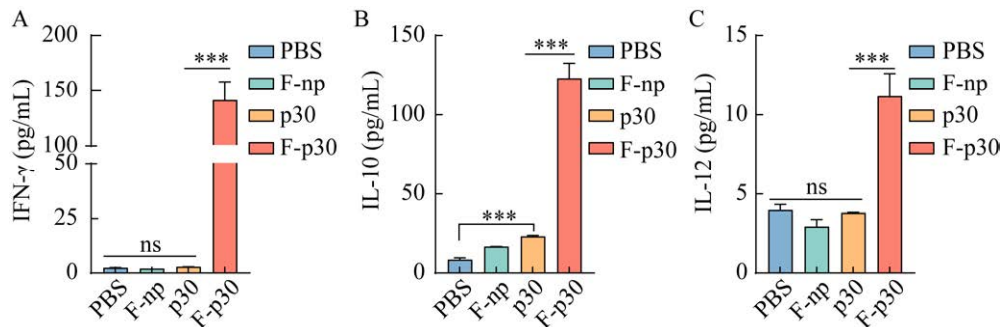


图 10 刺激淋巴细胞后分泌的 IFN- γ (A)、IL-10 (B)、IL-12 (C) 细胞因子的含量

Figure 10 Cytokines IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-12 (C) after stimulation of lymphocytes with p30 protein. The results are expressed as $\bar{x} \pm s$. ns: $P > 0.05$ (no obvious difference); ***: $P < 0.001$ (extremely significant difference).

3 讨论与结论

2018年非洲猪瘟传入我国,对我国及世界养猪行业产生巨大的影响^[26-27]。根据世界动物卫生组织报道,2022-2024年全球因非洲猪瘟导致超过138万只猪死亡^[28]。目前仍没有有效的药物和商品化疫苗用于防控,因此急需研发有效的疫苗。非洲猪瘟病毒p30蛋白是由CP204L基因编码的重要的早期结构蛋白,在病毒内化过程中具有重要作用,具有良好的免疫原性。生物信息学预测p30蛋白质存在糖基化及磷酸化修饰,实验室前期选择利用SF9昆虫表达系统及CHO表达系统表达该蛋白,但表达量很低,进而选择遗传背景清晰、成本低、易于扩大生产的大肠杆菌表达系统(结果尚未发表)。利用原核表达的p30蛋白产量很高,虽然不能完全具有天然蛋白质结构,但仍具有较好的免疫原性,与其他抗原组合后免疫能对非洲猪瘟病毒的攻击提供有效的保护。而在此基础上进一步提升抗原的免疫原性,也是当前研究中需要解决的问题。

铁蛋白纳米颗粒能够在颗粒表面偶联24拷贝的抗原,形成八面体笼状结构^[21],抗原在颗粒表面组装有利于保护性表位的暴露并与多个B细胞抗原受体(B-cell receptor, BCR)高效交联能产生更好的B细胞激活,引起更强的机体免疫应答,已被用于多种病毒疫苗的开发设计^[24]。颗粒本身的尺寸大小又有利于被抗原递呈细胞所摄取,并与补体结合延长在机体淋巴滤泡的滞留,产生强效的抗原递呈作用^[24]。基于铁蛋白纳米颗粒平台将新冠病毒的受体结合域(RBD)及流感血凝素蛋白(hemagglutinin, HA)成功展现在颗粒表面,其诱导的中和抗体水平比传统疫苗高10倍左右^[8,29],表现出良好的免疫保护效果。

本研究将p30蛋白偶联在铁蛋白颗粒表

面,采用较常用的SpyCatcher/SpyTag^[14-16]技术,在体外可将抗原蛋白与颗粒蛋白这两部分实现组装,避免在颗粒表面过度密集展现抗原而对抗原的空间结构产生影响,也避免直接融合表达降低蛋白的表达难度。F-p30纳米颗粒免疫小鼠能产生更强的特异性抗体,在体内诱导更强的细胞和体液免疫应答。同时本研究检测到在小鼠的淋巴结中T_{FH}和GCB比例升高,这与已有的文献报道相一致,蛋白纳米颗粒能够进入淋巴结,且在淋巴结滞留,引起T_{FH}和GCB比例升高^[12],从而引起更强的免疫激活作用并产生高亲和力的抗体^[30-31]。在体外也观察到小鼠BMDC细胞对F-p30纳米颗粒有明显的摄取,这可能是由于颗粒的尺寸更有利于被抗原递呈细胞摄取^[7,32]。因此F-p30纳米颗粒免疫小鼠更有利于激活淋巴结的免疫响应,产生更好的抗原递呈作用。

综上所述,本研究以铁蛋白为基础实现了对非洲猪瘟p30蛋白的模块化组装。F-p30纳米颗粒能够在小鼠体内产生更高水平的特异性抗体,引起淋巴结T_{FH}细胞和GCB比例的升高,刺激脾脏T细胞的活化,产生更高水平的细胞因子。这些结果表明,偶联p30蛋白的铁蛋白颗粒能诱导机体产生更强的体液和细胞免疫应答,在非洲猪瘟疫苗研究开发过程中具有良好的应用潜力。

REFERENCES

- [1] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, REVILLA Y, RODRIGUEZ F, ESCRIBANO JM. ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae[J]. The Journal of General Virology, 2018, 99(5): 613-614.
- [2] CHAPMAN DAG, TCHEREPANO V, UPTON C, DIXON LK. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates[J]. The Journal of General Virology, 2008, 89(Pt 2): 397-408.

- [3] WANG N, ZHAO DM, WANG JL, ZHANG YL, WANG M, GAO Y, LI F, WANG JF, BU ZG, RAO ZH, WANG XX. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 640-644.
- [4] YUE J, LIU Y, ZHAO M, BI X, LI G, LIANG W. The R&D landscape for infectious disease vaccines[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(11): 867-868.
- [5] KHALAJ-HEDAYATI A, CHUA CLL, SMOOKER P, LEE KW. Nanoparticles in influenza subunit vaccine development: immunogenicity enhancement[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2020, 14(1): 92-101.
- [6] XU M, QI Y, LIU G, SONG Y, JIANG X, DU B. Size-dependent *in vivo* transport of nanoparticles: implications for delivery, targeting, and clearance[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(21): 20825-20849.
- [7] BACHMANN MF, JENNINGS GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(11): 787-796.
- [8] QIAO YB, LI S, JIN SH, PAN Y, SHI YH, KONG W, SHAN YM. A self-assembling nanoparticle vaccine targeting the conserved epitope of influenza virus hemagglutinin stem elicits a cross-protective immune response[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(8): 3250-3260.
- [9] 苏恺, 王亚文, 袁晨, 刘志昌, 徐凡, 任静, 张亚楠, 杨柳, 付利芝, 宋勤叶. 猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白-铁蛋白纳米颗粒的制备及其免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(11): 2203-2211.
- SU K, WANG YW, YUAN C, LIU ZC, XU F, REN J, ZHANG YN, YANG L, FU LZ, SONG QY. Preparation and immunogenicity of porcine epidemic diarrhea virus S1 protein-ferritin nanoparticles[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(11): 2203-2211 (in Chinese).
- [10] ZAKERI B, FIERER JO, CELIK E, CHITTOCK EC, SCHWARZ-LINEK U, MOY VT, HOWARTH M. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(12): E690-E697.
- [11] VESTER SK, RAHIKAINEN R, KHAIRIL ANUAR INA, HILLS RA, TAN TK, HOWARTH M. SpySwitch enables pH- or heat-responsive capture and release for plug-and-display nanoassembly[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3714.
- [12] WANG WJ, ZHOU XX, BIAN YJ, WANG S, CHAI Q, GUO ZQ, WANG ZN, ZHU P, PENG H, YAN XY, LI WH, FU YX, ZHU MZ. Dual-targeting nanoparticle vaccine elicits a therapeutic antibody response against chronic hepatitis B[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(5): 406-416.
- [13] LAMPINEN V, GRÖHN S, SOPPELA S, BLAZEVIC V, HYTÖNEN VP, HANKANIEMI MM. SpyTag/SpyCatcher display of influenza M2e peptide on norovirus-like particle provides stronger immunization than direct genetic fusion[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1216364.
- [14] RAHIKAINEN R, RIJAL P, TAN TK, WU HJ, ANDERSSON AM C, BARRETT JR, BOWDEN TA, DRAPER SJ, TOWNSEND AR, HOWARTH M. Overcoming symmetry mismatch in vaccine nanoassembly through spontaneous amidation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(1): 321-330.
- [15] BRUNE KD, HOWARTH M. New routes and opportunities for modular construction of particulate vaccines: stick, click, and glue[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1432.
- [16] KANG YF, SUN C, ZHUANG Z, YUAN RY, ZHENG QB, LI JP, ZHOU PP, CHEN XC, LIU Z, ZHANG X, YU XH, KONG XW, ZHU QY, ZHONG Q, XU M, ZHONG NS, ZENG YX, FENG GK, KE CW, ZHAO JC, et al. Rapid development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 2738-2752.
- [17] WANG Z, AI Q, HUANG S, OU Y, GAOY, TONG T, FAN H. Immune escape mechanism and vaccine research progress of African swine fever virus[J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(3): 344.
- [18] GÓMEZ-PUERTAS P, RODRÍGUEZ F, OVIEDO JM, BRUN A, ALONSO C, ESCRIBANO JM. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response[J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.
- [19] LIU WM, LI HC, LIU B, LV TX, YANG CC, CHEN S, FENG LQ, LAI LX, DUAN ZY, CHEN XW, LI PC, GUAN SH, CHEN L. A new vaccination regimen using adenovirus-vectored vaccine confers effective protection against African swine fever virus in swine[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(2): 2233643.
- [20] TAN TK, RIJAL P, RAHIKAINEN R, KEEBLE AH, SCHIMANSKI L, HUSSAIN S, HARVEY R, HAYES JWP, EDWARDS JC, McLEAN RK, MARTINI V,

- PEDRERA M, THAKUR N, CONCEICAO C, DIETRICH I, SHELTON H, LUDI AN, WILSDEN G, BROWNING C, ZAGRAJEK AK, et al. A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 542.
- [21] ZHAO Z, CHEN X, CHEN Y, LI H, FANG K, CHEN H, LI X, QIAN P. A self-assembling ferritin nanoplatform for designing classical swine fever vaccine: elicitation of potent neutralizing antibody[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(1): 45.
- [22] KANEKIYO M, BU W, JOYCE MG, MENG G, WHITTLE JRR, BAXA U, YAMAMOTO T, NARPALA S, TODD JP, RAO SS, McDERMOTT AB, KOUP RA, ROSSMANN MG, MASCOLA JR, GRAHAM BS, COHEN JI, NABEL GJ. Rational design of an epstein-barr virus vaccine targeting the receptor-binding site[J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1090-1100.
- [23] DEMCHUK AM, PATEL TR. The biomedical and bioengineering potential of protein nanocompartments[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 41(1): 107547.
- [24] MA XC, ZOU F, YU F, LI R, YUAN YC, ZHANG YW, ZHANG XT, DENG JY, CHEN T, SONG Z, QIAO YD, ZHAN YK, LIU J, ZHANG JS, ZHANG X, PENG ZL, LI YZ, LIN YT, LIANG LT, WANG GW, et al. Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses[J]. *Immunity*, 2020, 53(6): 1315-1330.e9.
- [25] 刘家兴, 韩雪英, 张鑫茹, 邓嘉昕, 姚伦广, 刘阳坤. 携带猪流行性腹泻病毒抗原表位的铁蛋白纳米颗粒制备与免疫原性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(4): 1567-1574.
- LIU JX, HAN XY, ZHANG XR, DENG JX, YAO LG, LIU YK. Preparation and immunogenicity analysis of ferritin nanopartivles carrying antigentic epitopes of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(4): 1567-1574 (in Chinese).
- [26] 陈腾, 张守峰, 周鑫韬, 李楠, 缪发明, 张静远, 刘晔, 吕宗吉, 张国军, 扈荣良. 我国首次非洲猪瘟疫情的发现和流行分析[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(9): 1831-1832.
- CHEN T, ZHANG SF, ZHOU XT, LI N, MIU FM, ZHANG JY, LIU Y, LÜ ZJ, ZHANG GJ, HU RL. The discovery and epidemiological analysis of the first African swine fever epidemic in China[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(9): 1831-1832 (in Chinese).
- [27] 张振江, 孙恩成, 朱远茂, 李芳, 步志高, 赵东明. 中国非洲猪瘟研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53(12): 1767-1779.
- ZHANG ZJ, SUN EC, ZHU YM, LI F, BU ZG, ZHAO DM. Research progress on African swine fever in China[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2023, 53(12): 1767-1779 (in Chinese).
- [28] African swine fever (ASF)-situation report 48[EB/OL]. [2024-11-03]. <https://www.woah.org/app/uploads/2024/03/asf-report48.pdf>.
- [29] KANG YF, SUN C, SUN J, XIE C, ZHUANG Z, XU HQ, LIU Z, LIU YH, PENG S, YUAN RY, ZHAO JC, ZENG MS. Quadrivalent mosaic HexaPro-bearing nanoparticle vaccine protects against infection of SARS-CoV-2 variants[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2674.
- [30] BRYANT VL, HODGKIN PD. Life, death, and antibodies[J]. *Science*, 2017, 358(6360): 171-172.
- [31] HE RZ, ZHENG XY, ZHANG J, LIU B, WANG QJ, WU Q, LIU ZY, CHANG FF, HU YB, XIE T, LIU YC, CHEN J, YANG J, TENG SS, LU R, PAN D, WANG Y, PENG LT, HUANG WJ, TERZIEVA V, et al. SARS-CoV-2 spike-specific TFH cells exhibit unique responses in infected and vaccinated individuals[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 393.
- [32] DAVIS ME. Fighting cancer with nanoparticle medicines: the nanoscale matters[J]. *MRS Bulletin*, 2012, 37(9): 828-835.

(本文责编 郝丽芳)