

H5 亚型流感病毒 HA 头部球状结构域在毕赤酵母中的高效表达及其免疫原性分析

范文辉¹, 王萌^{1,2}, 刘丽蓉^{1,2}, 张鹤¹, 张爽¹, 凌红丽³, 刘文军^{1,2}, 李晶^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 青岛蔚蓝生物制品有限公司, 山东 青岛 266114

范文辉, 王萌, 刘丽蓉, 等. H5 亚型流感病毒 HA 头部球状结构域在毕赤酵母中的高效表达及其免疫原性分析. 生物工程学报, 2019, 35(1): 49–58.

Fan WH, Wang M, Liu LR, et al. High expression and immunogenicity analysis of HA globular head domain of H5 subtype avian influenza virus produced in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 49–58.

摘要: 为了研究 H5 亚型流感病毒 HA 蛋白中头部球状结构的免疫原性及其基因优化对蛋白表达的影响, 本研究构建了重组真核表达载体 pPICZ α A-H5HA, 并将其转化至毕赤酵母, 经筛选获得重组菌株。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果分析显示, 目的蛋白可在酵母中高效分泌表达, 发酵液上清中目的蛋白浓度高达 0.2 mg/mL, 分子量约为 37 kDa。将酵母发酵上清经浓缩、纯化后, 获得重组目的蛋白 H5HA。将不同剂量的 H5HA 与不同佐剂联用后分别以滴鼻和肌肉注射两种方式免疫试验动物, 进行免疫效力的评价。试验结果表明, H5HA 具有较好的免疫原性, 可诱导 SPF 鸡产生较高水平的 IgG (血凝抑制效价达 1:64、病毒中和抗体效价为 1:218), 最佳使用剂量为 50 μ g/羽, 与白油佐剂联用时效果最佳, 且肌肉注射方式的免疫效果优于滴鼻方式。研究结果为 H5 亚型流感病毒亚单位疫苗的研制提供了理论支撑。

关键词: H5 亚型流感病毒, 血凝素蛋白, 毕赤酵母, 亚单位疫苗

Received: April 16, 2018; **Accepted:** August 15, 2018

Supported by: National Key R&D Program of China (Nos. 2017YFD051105, 2016YFC1201303), Talent Program of Qingdao Talents Special Zone.

Corresponding author: Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

国家重点研发计划 (Nos. 2017YFD051105, 2016YFC1201303), 青岛“人才特区”人才项目资助。

High expression and immunogenicity analysis of HA globular head domain of H5 subtype avian influenza virus produced in *Pichia pastoris*

Wenhui Fan¹, Meng Wang^{1,2}, Lirong Liu^{1,2}, He Zhang¹, Shuang Zhang¹, Hongli Ling³, Wenjun Liu^{1,2}, and Jing Li^{1,2}

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Qingdao Vland Biologicals Co. Ltd., Qingdao 266114, Shandong, China

Abstract: To evaluate the immunogenicity of HA globular head domain of H5 subtype influenza virus (H5HA), the gene of H5HA was optimized and the recombinant pPICZaA-H5HA expressing vector was constructed and transfected into *Pichia pastoris*. The expression of the recombinant H5HA was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting and the results demonstrated that the recombinant H5HA (37 kDa) was highly expressed in *Pichia pastoris* with concentration of 0.2 mg/mL in medium. The recombinant H5HA was concentrated and purified using Ni-NTA affinity chromatography. The immunogenicity of H5HA was evaluated by immunizing eight groups of chicken through intranasal or intramuscular injection with different doses of purified H5HA combined with different adjuvants, respectively. The results showed that the recombinant H5HA could induce high level IgG (HI titer was 1:64 and neutralizing antibody titer was 1:218) and the optimal dosage of the recombinant H5HA was 50 µg combined with oil. In addition, intramuscular injection was better than nasal immunization. This study provided a theoretical support for subunit vaccine development.

Keywords: H5N1 influenza viruses, hemagglutinin, *Pichia pastoris*, subunit vaccine

流感病毒 (Influenza virus) 属于正粘病毒科, 是单股负链分节段的 RNA 病毒。根据核蛋白 (NP) 和基质蛋白 (M1) 上抗原决定簇的不同, 流感病毒可分为 A、B、C、D 四型^[1-3], 其中 A 型和 B 型可给人类的健康带来威胁, 尤其是 A 型, 每年因全球季节性流感和散发性流感而导致大约 30 万–50 万人死亡, 死亡率高达 60%^[4-5]。除了感染人类外, A 型流感病毒还可以引起禽类、猪及其他哺乳动物流感的发生^[6]。在鸡群中流行的 A 型流感病毒包括 H5N1、H5N2、H7N9 及 H9N2 等亚型, 其中, H5N1 和 H7N9 已引起了全世界的关注, 因为这些亚型不但可以引起人类感染发病并造成较高的死亡率, 且有潜力发生变异, 更容易出现跨物种传播^[7]。根据流感病毒对禽类的致病力不同, 可将其分为高致病性禽流感病毒 (HPAI) 和低致病性禽流感病毒 (LPAI)^[8]。1997 年香港发

生的直接由鸡群传染给人的高致病性禽流感, 造成了 18 人感染 6 人死亡, 其病原即为高致病性禽流感病毒 (H5N1 亚型)^[9-10]。最近, 由 HPAI 导致的禽流感在韩国和日本也有发生, HPAI 作为一种人畜共患病病原, 不但给养殖业带来了巨大的经济损失, 而且对人类的公共卫生安全也造成了严重的威胁^[11], 因此, 对 HPAI 的防控显得尤为重要。

禽流感的防控一直是全世界关注的焦点, 也是世界性难题。目前防治禽流感发生的主要手段为疫苗接种^[12], 常用的 H5 亚型流感疫苗为全病毒灭活疫苗, 如我国市售的 Re-1、Re-4、Re-5、Re-6、Re-7、Re-8 和 Re-10 株等, 但该类型的疫苗在生产过程中涉及到了活病毒的操作, 所以存在生物安全风险。除此之外, 还有重组活载体疫苗、DNA 疫苗等, 由于重组载体疫苗存在影响二次免疫, DNA 疫苗免疫期长且需多次免疫, 不适

用于紧急预防,所以市场上未见大量应用,因此研发出新型高效的 H5 亚型亚单位疫苗已是迫在眉睫^[13-14]。亚单位疫苗是利用微生物的某种表面结构成分(抗原)制成无核酸且能诱发机体产生抗体的疫苗,与常规疫苗相比生产简单、快速且安全^[15]。HA 蛋白是流感病毒表面的主要保护性抗原,也是研究亚单位疫苗的主要靶标抗原。研究人员认为 HA 蛋白头部球状结构是禽流感主要的保护性抗原。HA 抗体滴度的高低从某种程度上能够反映机体对于禽流感病毒的抵抗力。随着基因工程技术的飞速发展,研究人员将 HA 基因克隆至真核表达载体上,转化至真核生物或细胞中进行表达。毕赤酵母表达系统具有蛋白翻译后的修饰功能,因此该系统已被广泛应用于异源蛋白的高效表达,表达产物具有良好的免疫原性^[16]。

本研究利用毕赤酵母表达系统,将编码 HA 蛋白头部球状结构的基因插入至 pPICZ α A 表达载体,并电击转化至毕赤酵母,筛选得到高效表达重组菌,然后进行发酵罐高密度发酵,浓缩纯化得到目的蛋白,加入佐剂,研制成亚单位疫苗进行免疫效果评价,为 H5 亚型流感的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及实验动物

大肠杆菌 TOP10、毕赤酵母 X33 菌株及 pPICZ α A 空载、MDCK 细胞由本实验室保存,SPF 鸡胚(10 日龄)、SPF 鸡(1 日龄、21 日龄)购自(北京)梅里亚动物保健有限公司;5 周龄雌性 BALB/c 小鼠、4 月龄雌性日本大耳白兔购自(北京)梅里亚动物保健有限公司。

1.2 主要试剂

Pfu 酶、*Taq* 酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)

有限公司;质粒提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、TMB 底物显色液购自天根生化科技(北京)有限公司;96 孔酶标板购自上海源叶生物科技有限公司;Ni-NTA His Bind Resin 购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白预染 marker 购自宝林科(北京)生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鸡 IgG 购自达科为生物技术有限公司;小鼠抗 6 \times His 标签单克隆抗体购自博奥瑞京(北京)科技发展有限公司(Anti-His Tag Mouse Monoclonal Antibody, 货号:ABI001t);白油购自郑州索飞经贸有限公司(货号:VG5852674P);H5N1 阳性血清及 SPF 鸡阴性血清购自哈尔滨维科生物技术开发公司。甲醇购自上海晶纯生化科技股份有限公司;市售疫苗为广东温氏大华农生物科技有限公司(重组禽流感病毒灭活疫苗,H5N1 亚型,Re-6 株,批号:兽药临字 190022297);所有引物均由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.3 表达载体的构建

参照 GenBank(登录号 KC261467.1)中 H5N1 亚型流感病毒血凝素基因的头部球状区序列(60-300 aa),对其进行酵母表达密码子优化,使其利于在毕赤酵母中表达,将优化后的目的片段连入 pPICZ α A 载体,获得重组质粒 pPICZ α A-H5HA。

1.4 重组质粒 pPICZ α A-H5HA 线性化

将带有重组表达质粒 pPICZ α A-H5HA 的大肠杆菌 TOP10 置于 LB 液体培养基中,培养 12-15 h,提取 pPICZ α A-H5HA 质粒。利用 *Sac* I 酶切 pPICZ α A-H5HA 质粒使其线性化,获得线性化质粒。

1.5 毕赤酵母 X33 的电转化

向 90 μ L X33 感受态细胞内加入 10 μ L 线性化的 pPICZ α A-H5HA 质粒,混匀后将其加入预冷的石英电转化杯中,冰浴 5 min 后放入电转仪的

槽中进行电击转化。将转化后的混合液转入离心管后置于 30 °C 孵箱中, 静置 1 h。然后将离心管中的混合液以 2 500 r/min 的转速离心 2 min, 用 200 μ L 上清重悬细胞沉淀, 然后将重悬细胞均匀涂布于含 100 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板上, 30 °C 孵育 3–5 d 观察, 挑取单菌落进行扩大培养、鉴定。

1.6 重组酵母的诱导表达和目的蛋白鉴定

将鉴定为阳性的菌液取 500 μ L 加入到含 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、300 r/min 培养至 OD_{600} 为 2–6。将培养液离心 (5 min, 3 000 r/min), 弃上清, 将菌体用 15 mL BMMY 重悬, 调整 OD_{600} 为 1.0 左右并将菌体转移至 150 mL 的摇瓶中, 置于 30 °C、300 r/min 条件下继续培养。每间隔 24 h 向培养基中添加 100% 的甲醇溶液至终浓度为 0.5%–1.0% 进行诱导。分别于诱导后 0 h、24 h、48 h、72 h 取样进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 鉴定目的蛋白表达情况及最佳诱导时间。

1.7 重组蛋白的纯化及候选疫苗制备

将发酵液以 12 000 r/min 离心 10 min, 去除上清中的杂质, 然后用 10 kDa 的浓缩管进行浓缩。将浓缩后上清用镍柱进行亲和层析纯化, 然后再利用 Superdex 2000 层析柱进行分子筛纯化, 收集目的蛋白 H5HA 所在的洗脱峰, SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

将纯化后 H5HA 蛋白与白油混合: 首先在 H5HA 蛋白中加入终浓度为 4% 的吐温-80, 然后再加入等体积的白油, 充分乳化制成候选疫苗 LW001 (含 20 μ g/200 μ L H5HA) 和候选疫苗 LW002 (含 50 μ g/200 μ L H5HA), 用于注射免疫。将纯化后 H5HA 蛋白与寡聚脱氧核苷酸 (CpG-ODNs)^[17-18] 混合, 向每 200 μ L 的 H5HA 蛋白中加入 50 μ g 的 CpG-ODNs, 并将二者混合均匀后制成候选疫苗 LW003 (含 20 μ g/200 μ L H5HA)

和候选疫苗 LW004 (含 50 μ g/200 μ L H5HA), 用于滴鼻免疫。同时设置市售灭活疫苗及 PBS 阴性对照组。

1.8 SPF 鸡免疫试验

将 SPF 鸡随机分为 8 组, 每组 6 羽, 试验分组见表 1, 初次免疫 14 d 后加强免疫 1 次, 每羽鸡免疫剂量为 200 μ L。于 14 d 和 28 d 经翅静脉采血并分离得到血清, 进行血凝抑制 (HI) 效价及 ELISA 效价检测。

1.9 间接 ELISA 检测血清 IgG

用大肠杆菌表达的纯化后的 H5HA 蛋白作为包被抗原 (200 ng/孔, 100 μ L 孔), pH 9.6 的碳酸盐作为包被液, 4 °C 过夜包被。包被后用洗涤液 (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, Tween-20 0.05%, pH 7.2) 洗涤 3 次, 之后每孔加入 200 μ L 复合封闭液 (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, 山羊血清 50 mL/L, 明胶溶液 5 mL/L, 酪蛋白 2 g/L, 蔗糖 10 g/L, pH 7.2), 37 °C 封闭 2 h 后洗涤 3 次。加入用复合抗体稀释液 (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g/L, KH_2PO_4 0.24 g/L, 山羊血清 20 mL/L, 酪蛋白 1 g/L, 蔗糖 5 g/L, 吐温-20 0.05%, pH 7.2) 稀释的待检血清, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h 后洗涤。加入 HRP 标记的羊抗鸡 IgG, 每孔 100 μ L, 37 °C

表 1 SPF 鸡分组免疫情况

Table 1 Immunization regimens of candidate vaccine

Group ID	Candidate vaccine	Administration route
1	LW001	
2	LW002	Intramuscular injection
3	Commercial vaccine	
4	PBS (Control)	
5	LW003	
6	LW004	Nasal inhalation
7	Commercial vaccine	
8	PBS (Control)	

孵育 1 h 后洗涤 5 次。加入显色液和终止液。最后用酶标仪测定 450 nm 下的吸光值 (OD_{450} 值)。

1.10 血凝抑制试验

利用流感病毒血凝抑制试验方法^[19], 测定免疫后 14 d 及 28 d 血清中抗体效价, 评价免疫效果。当被检血清 HI 效价大于等于 $4 \log_2$ 时, 可判定为 H5 亚型流感病毒抗体阳性。

1.11 动物安全性试验

选取 1 日龄雏鸡 10 羽, 于腿部肌肉分别注射候选疫苗 (LW001 和 LW002) 0.1 mL; 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠 10 只, 于腿部肌肉分别注射候选疫苗 0.1 mL (LW001 和 LW002); 4 月龄健康的雌性日本大耳白种兔 6 只, 腿部肌肉注射候选疫苗 0.4 mL (LW001 和 LW002); 7 日龄雏鸡 10 羽, 滴鼻接种候选疫苗 (LW003 和 LW004) 0.1 mL; 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠 10 只, 滴鼻免疫候选疫苗 0.1 mL (LW003 和 LW004); 4 月龄健康的雌性日本大耳白种兔 6 只, 滴鼻免疫候选疫苗 0.4 mL (LW003 和 LW004) 观察 14 d, 记录局部反应和临床症状。

1.12 血清-病毒中和试验

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 将 MDCK 细胞分至 96 孔细胞培养板, 100 μ L/孔, 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 条件下培养至 90% 汇合度时待用; 将 SPF 鸡血清于 56 $^{\circ}C$ 灭活 30 min, 并进行 2 倍倍比稀释后与含 100 TCID₅₀ H5N1 流感病毒的无血清 DMEM 均匀混合后, 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h; 弃去 96 孔板中细胞培养基, 加入血清-病毒混合物 100 μ L/孔, 置于培养箱中吸附 1 h; 弃去 96 孔板中的血清-病毒混合物, 吸干各孔中的残留液后, 加入含 1% FBS 的 DMEM, 培养 3 d; 然后于光学显微镜下观察细胞病变 (CPE), 记录病变孔数目, 运用 Reed-Muench 法计算中和抗体效价。H5 亚型流感病毒强毒感染试验均在中国科学院武汉病毒研究所生物安全三级实验室操作。

2 结果与分析

2.1 融合 HA 基因的 PCR 扩增结果

将人工合成的 H5 亚型流感病毒 HA 蛋白头部球状结构域基因克隆至 pPICZ α A, 构建重组真核表达质粒 pPICZ α A-H5HA 并将其电击转化至毕赤酵母中后涂布抗性平板, 随机挑取 5 个单克隆进行 PCR 扩增鉴定。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 750 bp 处出现特异性片段 (图 1), 与预期的结果相符。同时, 对重组质粒 pPICZ α A-H5HA 进行测序。测序结果表明, 目的基因序列正确, 且未发生碱基突变, 重组表达载体构建成功。

2.2 目的蛋白的表达、纯化及鉴定

分别收取甲醇诱导前与诱导后 24、48、72 h 酵母上清进行 SDS-PAGE。因为在酵母发酵过程中, 随着酵母培养时间的延长, 培养液会逐渐减少且污染机会大大增加, 因此选择 72 h 作为最佳诱导时间。将诱导 72 h 后的培养液离心后上清用浓缩管浓缩, 再用镍柱亲和层析及 Superdex 2000 分子筛层析进行纯化。图 2A 为诱导不同时间后发酵液上清中目的蛋白的表达情况, 由结果可见, 未添加甲醇进行诱导时, 目的蛋白不表达,

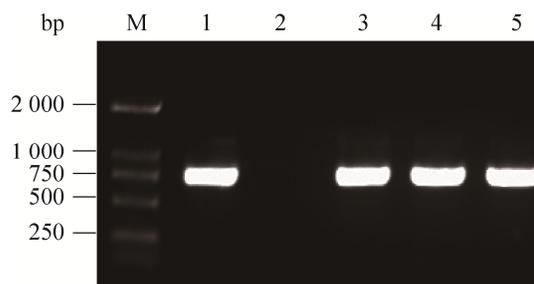


图 1 重组酵母菌的 PCR 产物鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant yeasts by PCR. M: DNA marker; 1: product using plasmid pPICZ α A-H5HA as amplification template; 2: product using empty plasmid pPICZ α A as amplification template; 3-5: product using three different recombinant yeast cells as amplification template.

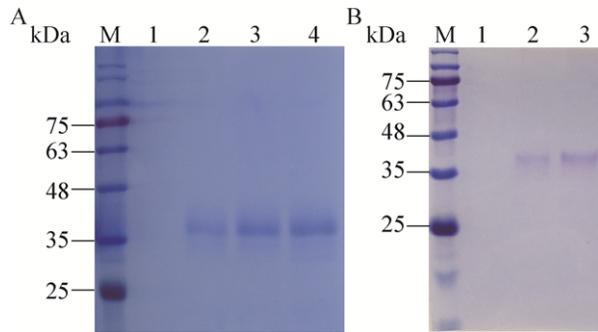


图2 重组蛋白 H5HA 表达及纯化的 SDS-PAGE 鉴定
Fig. 2 Identification of expression and purification of H5HA by SDS-PAGE. (A) M: marker; 1: the supernatant before induction; 2–4: the supernatant after 24 h, 48 h and 72 h induction, respectively. (B) M: marker; 1: supernatant before induction; 2: supernatant after 72 h induction; 3: purified H5HA protein.

添加甲醇诱导后, 目的蛋白开始表达, 且表达量在诱导后的 24–72 h 内随着诱导时间的延长, 表达量逐渐升高, 以 72 h 时发酵液上清中目的蛋白含量达到最高, 达到 0.2 mg/mL, 且分子量大小符合预期, 约为 37 kDa。图 2B 为纯化后的目的蛋白 H5HA, 由结果可见, 纯化后的目的蛋白条带单一、纯度较高。

目的蛋白带有 6×His 标签, 因此可采用抗 6×His 标签的抗体检测 H5HA 蛋白的特异性。Western blotting 分析结果显示, 目的蛋白能够对抗 6×His 标签的抗体产生特异性反应, 分子量大小正确且条带单一, 说明目的蛋白具有良好的特异性 (图 3)。

2.3 免疫后 SPF 鸡血清中 IgG 抗体水平

用间接 ELISA 方法检测各组 SPF 鸡初次免疫后 14 d 与二次免疫后 14 d 时血清中 IgG 的含量, 如图 4 所示, 横坐标为免疫时间, 纵坐标为血清的 OD_{450} 值。血清中 IgG 的含量越高, OD_{450} 值也越高。结果显示, 肌肉注射 50 μ g/羽免疫组 (Group 2) 初次免疫及二次免疫后血清中 IgG 水平明显高于对照组血清的 IgG 水平, 与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)。肌肉注射 25 μ g/羽免疫

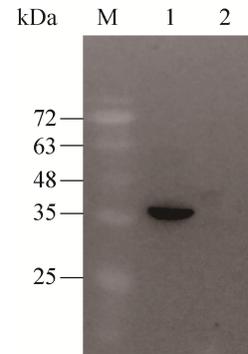


图3 H5HA 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of the induced recombinant H5HA protein. M: marker; 1: products from the induced; 2: the supernatant before induction.

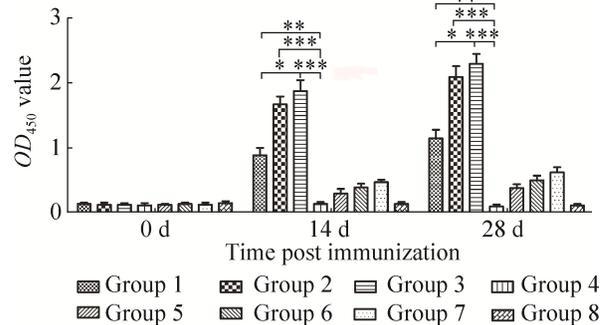


图4 各组 SPF 鸡血清不同时间点的 IgG 含量

Fig. 4 IgG level induced by H5HA in SPF chickens. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

组 (Group 1) 初次免疫及二次免疫后血清中 IgG 水平也高于对照组血清的 IgG 水平, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)。肌肉注射 50 μ g/羽免疫组 (Group 2) 初次免疫及二次免疫后血清中 IgG 水平与同条件下免疫市售疫苗免疫组 (Group 3) 相比, 其差异不显著, 表明酵母表达的 H5HA 蛋白具有较高的免疫原性。

2.4 免疫后 SPF 鸡血清 HI 效价

根据 HI 试验的操作方法, 测定 SPF 鸡初次免疫后 14 d 及二免后 14 d 血清 HI 效价, 结果重复 3 次, 取平均值。结果表明, HI 试验的结果与间接 ELISA 的结果相符, 当重组目的蛋白剂量为 50 μ g/羽, 使用白油作为佐剂, 且采用肌肉注射时 HI 能够达到较高水平, 仅次于同种免疫方式下的市售灭活疫苗 (表 2)。

表 2 免疫 H5HA 的各组 SPF 鸡的 HI 效价

Table 2 HI titers induced by H5HA in SPF chicken

Group ID	0 d	14 d	28 d
1	0	2 ²	2 ³
2	0	2 ⁴	2 ⁶
3	0	2 ⁵	2 ⁸
4	0	0	0
5	0	2 ⁰	2 ¹
6	0	2 ⁰	2 ²
7	0	2 ²	2 ³
8	0	0	0

2.5 动物安全性试验检测

为了检测亚单位疫苗实验室制品的安全性，分别给健康的雏鸡、BALB/c 小鼠及日本大耳白种兔接种候选疫苗，结果显示，免疫的动物均无红肿、硬结和流感的临床症状（表 3）。

2.6 血清-病毒中和试验结果

根据中和试验的操作方法，对 SPF 鸡初次免疫后 14 d 和二免后 14 d 的血清进行中和抗体效价测定，结果重复 3 次，取平均值。结果显示，病毒中和试验的结果与间接 ELISA 及 HI 试验的结果相符。当重组目的蛋白剂量为 50 μg/羽，使用白油作为佐剂，且采用肌肉注射时血清中的中和抗体效价为 1:218，与同等免疫条件下的市售灭活疫苗相比差异不显著（图 5）。

表 3 亚单位疫苗实验室制品的安全性检测

Table 3 The safety of different batches of H5HA subunit vaccines

Species	Batches	Challenge dose (mL)	Number	Method of administration	Clinical signs
Chickens	LW001	0.1	5	Intramuscular injection	—
	LW002	0.1	5	Intramuscular injection	—
	LW003	0.1	5	Nasal inhalation	—
	LW004	0.1	5	Nasal inhalation	—
Rabbits	LW001	0.4	3	Intramuscular injection	—
	LW002	0.4	3	Intramuscular injection	—
	LW003	0.4	3	Nasal inhalation	—
	LW004	0.4	3	Nasal inhalation	—
BALB/c mice	LW001	0.1	5	Intramuscular injection	—
	LW002	0.1	5	Intramuscular injection	—
	LW003	0.1	5	Nasal inhalation	—
	LW004	0.1	5	Nasal inhalation	—

Clinical signs (—): alive without clinical symptoms.

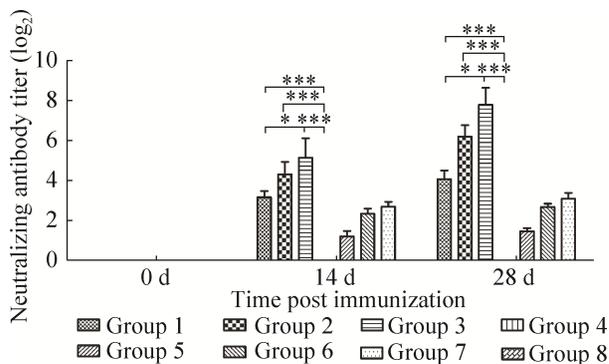


图 5 各组 SPF 鸡血清不同时间点的中和抗体效价

Fig. 5 Neutralizing antibody titer induced by H5HA in SPF chickens. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

A 型流感病毒作为人畜共患的病原，每年都会引起流感的暴发，引起较高的发病率和死亡率^[20]，其宿主范围广泛，包括人、猪、马、海洋哺乳动物、各类家禽野鸟等^[21]。在长期的进化中，广泛的宿主为 A 型流感病毒提供了更多点突变及重组重配机会，形成了新的人畜共患毒株，给人类及畜禽健康带来严重威胁。

接种疫苗是预防流感的有效途径，也是目前防控流感的主要手段。我国常用的 H5 亚型流感疫苗为灭活疫苗，随着不同毒株的流行，曾使用

过 Re-1、Re-4、Re-5、Re-6、Re-7、Re-8 和 Re-10 株等市售疫苗，但该类疫苗在生产过程中涉及到了活病毒的操作，所以存在生物安全风险，因此研发能诱导机体产生高中和活性抗体的亚单位疫苗已成为目前研究的热点。亚单位疫苗的成分一般为病毒的主要表面蛋白，不涉及活病毒操作，且免疫效果良好，是一种安全、有效的疫苗。

酵母表达系统是目前应用较为广泛的真核表达系统，不但具有翻译后修饰、加工、折叠等优点，而且酵母适合大规模发酵培养、生产成本低，已被广泛应用于亚单位疫苗、蛋白药物、食品保健等研究中^[22]，目前已有 30 多种生物制品（经 FDA 许可）由酵母表达系统生产，包括 HBV 的表面抗原亚单位疫苗等^[23-26]。

HA 是 A 型流感病毒表面主要糖蛋白之一，其通过与宿主靶细胞上的唾液酸受体结合介导病毒的侵入^[27]。由于禽流感病毒的 HA 蛋白能够诱导机体产生中和抗体，HA 蛋白头部球状结构是禽流感病毒主要的保护性抗原区域。HA 诱导的抗体效价的高低从某种程度上能够反映机体对于禽流感病毒的抵抗力^[28-29]。目前已有利用酵母表达的 H5N1 亚型流感病毒 HA 蛋白作为亚单位疫苗的报道^[14,30-31]，结果均表明，重组表达的 HA 蛋白免疫动物后血清中抗体的 ELISA 效价及血凝抑制效价均较高，如 Murugan 等利用酵母表达的 HA 蛋白进行小鼠试验发现，免疫后 49 d，10 μg 剂量组的血清抗体效价（间接 ELISA 法检测）可高达 1:700 以上，同时血凝抑制效价高达 1:200 以上^[14]。另外，Bright 等利用杆状病毒-昆虫细胞系统表达了由 H5N1 的 HA、NA 及 M1 组装而成的 VLPs，并将其免疫小鼠，结果表明，VLPs 诱发小鼠体内较高的 T 细胞及 B 细胞免疫应答，保护了小鼠免受致死剂量的重组 H5N1 流感病毒的攻击，但该研究未开展靶动物验证试验^[32]。

本研究结果表明，重组 H5HA 蛋白以分泌表达的方式大量存在于发酵液中，蛋白浓度可达 0.2 mg/mL，且纯度较高。另外，本研究将重组 H5HA 蛋白与佐剂联用制成亚单位疫苗，用 SPF 鸡进行免疫原性评价的结果显示，当重组 H5HA 蛋白免疫剂量为 50 μg/羽，使用白油作为佐剂且采用肌肉注射时，血清的 HI 效价能达到较高水平，具有较好的免疫原性，仅次于市售灭活疫苗。血清-病毒中和抗体效价为 1:218，与市售灭活疫苗相比，差异不显著。

本研究获得了重组目的蛋白 H5HA，实现了 H5N1 亚型流感病毒 HA 抗原基因在酵母表达系统中的高效表达，可作为 H5N1 流感病毒亚单位疫苗和诊断试剂的候选抗原。但重组蛋白 H5HA 作为亚单位疫苗免疫靶动物，抗体水平与市售灭活疫苗相比还有待提高。因此，本研究后续将从佐剂种类筛选、剂量筛选、与抗原混匀条件等方面继续优化工艺，同时补充稳定性试验、保存期试验、批间重复性试验等，为重组蛋白 H5HA 作为亚单位疫苗的使用提供理论支持。

REFERENCES

- [1] Nakatsu S, Murakami S, Shindo K, et al. Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes. *J Virol*, 2018, 92(6): e02084-17.
- [2] Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, et al. Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. *J Virol*, 2004, 78(16): 8771-8779.
- [3] Collin EA, Sheng ZZ, Lang YK, et al. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *J Virol*, 2015, 89(2): 1036-1042.
- [4] Luke CJ, Subbarao K. Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(7): 873-883.
- [5] Luo L, Nishi K, MacLeod E, et al. Expression and

- characterization of HA1 protein of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus for use in a serodiagnostic assay. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(2): 432–441.
- [6] Leung CH, Tseng HK, Wang WS, et al. Clinical characteristics of children and adults hospitalized for influenza virus infection. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(6): 518–525.
- [7] Yoo SJ, Kwon T, Lyoo YS. Challenges of influenza A viruses in humans and animals and current animal vaccines as an effective control measure. *Clin Exp Vaccine Res*, 2018, 7(1): 1–15.
- [8] Kamble NM, Hyong KJ, Lee JH. Intracellular delivery of HA1 subunit antigen through attenuated *Salmonella gallinarum* act as a bivalent vaccine against fowl typhoid and low pathogenic H5N3 virus. *Vet Res*, 2017, 48: 40.
- [9] Claas ECJ, Osterhaus ADME, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, 351(9101): 472–477.
- [10] Asahi-Ozaki Y, Itamura S, Ichinohe T, et al. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect*, 2006, 8(12/13): 2706–2714.
- [11] Phan HT, Ho TT, Chu HH, et al. Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants. *Vet Res*, 2017, 48: 53.
- [12] He F, Prabakaran M, Rajesh KS, et al. Monovalent H5 vaccine based on epitope-chimeric HA provides broad cross-clade protection against variant H5N1 viruses in mice. *Antiviral Res*, 2014, 105: 143–151.
- [13] Stachyra A, Pietrzak M, Maciola A, et al. A prime/boost vaccination with HA DNA and *Pichia*-produced HA protein elicits a strong humoral response in chickens against H5N1. *Virus Res*, 2017, 232: 41–47.
- [14] Murugan S, Ponselaran S, Kannivel L, et al. Recombinant haemagglutinin protein of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus expressed in *Pichia pastoris* elicits a neutralizing antibody response in mice. *J Virol Methods*, 2013, 187(1): 20–25.
- [15] Pose AG, Gómez JN, Sánchez AV, et al. Subunit influenza vaccine candidate based on CD154 fused to HAH5 increases the antibody titers and cellular immune response in chickens. *Vet Microbiol*, 2011, 152(3/4): 328–337.
- [16] Cos O, Ramón R, Montesinos JL, et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 17.
- [17] Qin T, Yin YY, Yu QH, et al. CpG oligodeoxynucleotides facilitate delivery of whole inactivated H9N2 influenza virus via transepithelial dendrites of dendritic cells in nasal mucosa. *J Virol*, 2015, 89(11): 5904–5918.
- [18] Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*, 2014, 32(48): 6377–6389.
- [19] Plant EP, Eick-Cost AA, Ezzeldin H, et al. The effects of birth year, age and sex on hemagglutination inhibition antibody responses to influenza vaccination. *Vaccines*, 2018, 6(3): 39.
- [20] Kumar B, Asha K, Khanna M, et al. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. *Arch Virol*, 2018, 163(4): 831–844.
- [21] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(6): 440–451.
- [22] Hu F, Li X, Lü J, et al. A visual method for direct selection of high-producing *Pichia pastoris* clones. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 23.
- [23] Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, et al. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol*, 2012, 824: 329–358.
- [24] Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982, 298(5872): 347–350.
- [25] Sonveaux N, Conrath K, Capiou C, et al. The topology of the S protein in the yeast-derived hepatitis B surface antigen particles. *J Biol Chem*, 1994, 269(41): 25637–25645.
- [26] Bill RM. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *J Pharm*

- Pharmacol, 2015, 67(3): 319–328.
- [27] Subathra M, Santhakumar P, Narasu ML, et al. Evaluation of antibody response in mice against avian influenza A (H5N1) strain neuraminidase expressed in yeast *Pichia pastoris*. J Biosci, 2014, 39(3): 443–451.
- [28] Athmaram TN, Singh AK, Saraswat S, et al. A simple *Pichia pastoris* fermentation and downstream processing strategy for making recombinant pandemic Swine Origin Influenza a virus Hemagglutinin protein. J Ind Microbiol Biotechnol, 2013, 40(2): 245–255.
- [29] Saelens X, Vanlandschoot P, Martinet W, et al. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. Eur J Biochem, 1999, 260(1): 166–175.
- [30] Kopera E, Dwornyk A, Kosson P, et al. Expression, purification and characterization of glycosylated influenza H5N1 hemagglutinin produced in *Pichia pastoris*. Acta Biochim Pol, 2014, 61(3): 597–602.
- [31] Subathra M, Santhakumar P, Satyam NS, et al. Expression of avian influenza virus (H5N1) hemagglutinin and matrix protein 1 in *Pichia pastoris* and evaluation of their immunogenicity in mice. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(7): 3635–3645.
- [32] Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. PLoS ONE, 2008, 3(1): e1501.

(本文责编 郝丽芳)