



乙肝病毒核心蛋白病毒样颗粒表面抗原密度对抗体应答水平的影响

李琪^{1,2}, 汤书兵², 周树敏¹, 钱志康^{2*}

¹上海大学生命科学学院, 上海 200000

²中国科学院上海巴斯德研究所中国科学院分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200000

摘要:【目的】为了探究乙肝病毒核心蛋白(Hepatitis B virus core protein, HBc)病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)表面抗原密度对免疫后抗体应答水平的影响, 制备了不同抗原密度的 HBc VLPs 疫苗, 并检测了其在小鼠体内的抗体应答水平。【方法】首先制备了 N 端带有 3 个甘氨酸的人巨细胞病毒重组抗原域 AD-4 作为模式抗原, 接着通过 Sortase A 的介导将 AD-4 连接到 HBc VLPs 表面上。将系列浓度梯度 AD-4 抗原在 Sortase A 介导下分别与相同浓度的 HBc VLPs 发生反应, 制备不同抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs。将其分别免疫 6–8 周龄 BALB/c 小鼠 3 次, 每次免疫间隔 2 w, 间接 ELISA 法检测被免疫小鼠血清的抗体应答水平。【结果】结果表明, 当 HBc VLPs 表面抗原密度为 44.4%时, 即 HBc 反应浓度: AD-4 反应浓度为 1:0.5 时, 不足以引起高滴度的抗体产生; 当 HBc VLPs 表面抗原密度为 64.2%时, 即 HBc 反应浓度: AD-4 反应浓度为 1:1 时, HBc-AD-4 VLPs 诱导的 AD-4 特异性抗体滴度与 100% 抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs 所引起的抗体滴度相当; 当 HBc VLPs 表面抗原密度大于 64.2%时, 引起的抗体应答水平不因抗原密度增加而进一步增强。【结论】发现了 HBc VLPs 表面抗原密度与免疫后抗体滴度呈正相关, 然而免疫 64.2%抗原密度的 HBc VLPs 所产生的抗体滴度可达峰值, 抗原密度进一步增加, 抗体应答水平不会进一步加强。

关键词: 病毒样颗粒, 抗原密度, 体液免疫, 乙肝病毒核心蛋白, Sortase A

传统的减毒或灭活疫苗可刺激机体产生强烈持久的免疫应答, 但是存在一些安全隐患, 同时无法有效应对具有高频突变特性的病原如人免疫

缺陷病毒、流感等。亚单位疫苗易于生产、安全有效、理化性质稳定^[1–3], 然而其免疫原性弱, 需纳米尺度的抗原载体来递送以增强免疫应答的强

基金项目: 国家自然科学基金(81572002); 国家重点研发计划项目(2016YFA0502101)

*通信作者。Tel: +86-21-54923105; E-mail: zkqian@ips.ac.cn

收稿日期: 2018-04-03; 修回日期: 2018-06-25; 网络出版日期: 2018-09-18

度和广度。纳米颗粒载体被抗原呈递细胞偏好性地吞噬, 促进其成熟并分泌多种细胞因子, 引发免疫级联反应。此外, 纳米载体表面展示的高度重复抗原直接交联 B 细胞受体, 降低 B 细胞激活阈值, 产生强烈持久的 B 细胞免疫应答^[2]。作为一种纳米颗粒, 病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)被广泛地应用于疫苗研发^[4-5]。乙肝病毒核心蛋白(Hepatitis B virus core protein, HBc)就是一种可自发组装形成正二十面体的 VLPs, 构象上模拟天然乙肝病毒粒子, 但不包含病毒遗传物质, 生物安全性较高^[5], 是疫苗研究中广泛使用的载体。

大多数病毒粒子表面的蛋白抗原在自然状态下高度重复地展示在其表面。抗原的这种有序重复的形式就是一种病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)能够有效地交联 B 细胞受体(B-cell receptors, BCRs), 向 B 细胞传递较强的激活信号, 增强体液免疫应答。但是, 目前关于疫苗载体表面重复抗原的密度对免疫应答影响的相关研究较少。我们已有的工作, 利用 Sortase A 酶的转肽功能, 把 HBc VLPs 开发成模块化纳米载体, 可在纳米颗粒表面便捷、特异地展示不同的多肽或蛋白抗原。转肽酶 Sortase A 可特异性地识别暴露于 HBc VLPs 表面的 LPETGG 序列, 断裂 T 和 G 之间的肽键, 形成 HBc-Sortase A 中间产物。而后 N 端带有 3 个甘氨酸的抗原多肽或蛋白亲核攻击中间产物, 替换下 Sortase A, 进而与 HBc VLPs 共价偶联, 实现在 VLPs 表面展示外源抗原。我们前面工作发现降低抗原底物的浓度, 会降低 VLPs 表面抗原的密度, 但是诱导的体液应答水平是否受影响尚不清楚。在自然状态下一些人类病毒粒子表面的抗原密度不尽相同。例如, 囊膜糖蛋白(Env)在 HIV 粒子表面的丰度很低, 每个粒子大约只含有 14 个拷贝^[6]。一个甲型

流感病毒粒子表面的血球凝集素(HA)大约有 500 个拷贝, 是非常密集的^[7]。在人工合成的纳米颗粒疫苗方面, Matthew 等研究发现, 低抗原密度的聚苯乙烯纳米颗粒疫苗更有效地刺激抗体的产生^[8]。因此, 研究 VLPs 表面抗原密度与体液免疫应答之间的关系, 具有较为重要的意义。

我们选取人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)^[9-10]的抗原域 AD-4 蛋白^[11-12]作为一个抗原表位的模型, 首次研究了 HBc VLPs 表面抗原密度对抗体滴度的影响。研究发现, HBc VLPs 表面 AD-4 抗原密度确实对免疫后特异性抗体滴度存在影响; 当抗原密度为 44.4%时, 即 HBc 浓度: AD-4 浓度为 1:0.5 时, 不足以引起高滴度的抗体产生; 当表面抗原密度为 64.2%时, 即 HBc 浓度: AD-4 浓度为 1:1 时, HBc-AD-4 VLPs 诱导的 AD-4 特异性抗体滴度与 100%抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs 所引起的抗体滴度相当; 抗原密度大于 64.2%时, 引起的抗体应答水平不因抗原密度增加而显著变化。这将为科学研究和工业化生产节约成本。我们的工作不仅可以节约抗原的使用量, 而且为有效疫苗的开发提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 本实验所用到的菌株 *E. coli* BL21(DE3)plysS 购自北京鼎国公司。本实验相关质粒 pET28a-HBc、pET28a-Sortase A、pET28a-AD-4 重组载体均由本实验室构建并保存。NaCl 购自国药公司, 蛋白胨和酵母提取物均购自 Oxoid 公司, Tris 购自 Amresco 公司, 硫酸铵购自上海实验试剂有限公司, 蛋白 Marker 购自

TaKaRa 公司, Ni-NTA 蛋白纯化树脂购自 Qiagen 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 实验动物: 实验所需小鼠为 BALB/c 小鼠, 6-8 周龄, 雌性, 45 只, 购自上海灵畅生物科技有限公司, 通过中国科学院上海巴斯德研究所动物伦理委员会批准, 批号: A2017016。

1.2 蛋白表达与纯化

将 pET28a-HBc、pET28a-Sortase A、pET28a-AD-4 重组载体^[13]转化到 *E. coli* BL21(DE3)plysS 中后, 挑单菌落, 于 20 mL LB 培养基中扩大培养, 摇过夜后全部接种到 500 mL 的含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、240 r/min 条件下培养至 OD_{600} 的值为 0.6-0.8 时(约 2 h 左右)加入 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 500 μL , 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、240 r/min 条件下诱导 4 h 使目的蛋白表达。4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min 离心 20 min 后收集菌体, 加入 30 mL 的 NT buffer (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 重悬, 工作 5 s, 停止 7 s, 35% 强度条件下冰上超声破碎菌体 12 min。之后将菌液匀浆在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 条件下离心 30 min。留下上清纯化目的蛋白。

AD-4 蛋白需要镍离子柱亲和层析纯化。该纯化全部在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下完成。将大肠杆菌裂解液上清(记为 input)倒入镍柱中, 混合 30 min。收集流穿液, 记为 flowthrough (图 1 中简称为 flow)。之后分别用 10 mL 含有 25 mmol/L、50 mmol/L 咪唑的 NT buffer 清洗与柱子结合的杂蛋白, 分别记为 w1 和 w2, 最后用 5 mL 含有 250 mmol/L 咪唑的 NT buffer 洗脱, 得到目的蛋白, 将洗脱液在 1 L 的 NT buffer 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下透析过夜。

Sortase A 蛋白需要两步纯化, 镍离子柱亲和

层析纯化后再进行蔗糖密度梯度离心纯化。用 NT buffer 配置 10%、20%、30%、40%、50%(质量/体积)的 5 份蔗糖溶液, 取每个浓度溶液 2 mL, 浓度由低到高依次用长针头注射器从底部加入 SW 41 超速离心管, 最后加入已透析好的 HBc 蛋白样品 2.5 mL。之后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、39000 r/min 条件下超速离心 2 h, 加速、减速均为 9。超离后, 每隔 1 mL 取样进行 SDS-PAGE 分析。

HBc 蛋白也需要两步纯化, 先进行硫酸铵盐析法得到 HBc 蛋白沉淀, 重悬后再使用蔗糖密度梯度离心法得到较为纯净的蛋白。向大肠杆菌裂解液上清中加入硫酸铵(每毫升裂解上清中加入 0.2 g 硫酸铵)。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡混匀, 使硫酸铵充分溶解, HBc 蛋白盐析沉淀在管底。之后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 条件下离心 30 min, 倒掉上清后贴壁加入 4 mL 的 NT buffer, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡使之混匀, 使 HBc 蛋白沉淀自然溶解, 最后使 HBc 溶解液在 1 L 的 NT buffer 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下透析过夜。第二步, HBc 蛋白需要进行蔗糖密度梯度离心纯化。步骤同上, 结束后每隔 1 mL 取样进行 SDS-PAGE 和琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 蛋白转肽反应体系的配制

配制 7 个转肽反应体系^[13], 每个体系 2 mL。分别加入 HBc 蛋白(反应浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$), Sortase A 蛋白(反应浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$), 以及 AD-4 蛋白(反应浓度分别为 20、40、80、120、160、200、240 $\mu\text{mol/L}$), 即 HBc 浓度: AD-4 浓度分别为 1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6。最后加入 CaCl_2 作为催化剂(反应浓度为 2 mmol/L), 体系不足 2 mL 的用 NT buffer 补齐至 2 mL。室温条件下转肽反应 2 h。

1.4 动物分组与免疫

将小鼠随机分成 9 组, 每组 5 只, 设置 1 个

PBS(NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, KH₂PO₄ 2 mmol/L, pH 7.4)对照组, 1个不含 AD-4 蛋白的 HBc 蛋白对照组, 以及 7 个不同 AD-4 抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs 试验组。采用腹腔注射的方法, 每只小鼠注射 10 μg 相应的蛋白(PBS 对照组接种相应体积的 PSB 溶液), 每隔 2 周接种 1 次, 共接种 3 次。每次接种前, 眼眶内眦取血 100 μL 左右, 把血样置于 37 °C 环境中, 凝血后, 4 °C、3000 r/min 条件下离心 5 min, 取血清待检测。

1.5 间接 ELISA 法检测免疫后小鼠抗血清效价

用间接酶联免疫吸附法(ELISA)来检测特异性抗体的滴度。将浓度为 0.2 ng/μL 的 AD-4 蛋白溶液包被 96 孔板, 50 μL/孔 4 °C 过夜孵育。之后用含有 1/1000 体积吐温的 PBS(PBST)洗涤 3 遍, 再用含 5%脱脂乳 PBS 溶液封闭 96 孔板, 37 °C 封闭 1 h, 之后 PBST 洗 3 遍。再将一系列的 1%脱脂乳梯度稀释的血清样品(分别按 1/10²、1/10³、1/10⁴、1/10⁵、1/10⁶、1/10⁷ 的比例稀释血清)以 50 μL/孔的体积加入 96 孔板, 在 37 °C 孵育 2 h。用 PBST 再次洗涤 3 遍后, 用含 1%脱脂乳的 PBST 以 1:5000 的比例稀释山羊抗鼠 IgG, 以 50 μL/孔的体积加入 96 孔板, 在 37 °C 孵育 1 h。用 PBST 清洗 3 遍, 每孔加入 TMB 显色液 50 μL, 显色后, 用 1 mol/L 硫酸终止显色反应, 50 μL/孔。使用酶标仪测定 ELISA 的 OD₄₅₀ 数值, 数值大于 0.2 时的稀释度即为该小鼠抗体滴度。

1.6 统计分析

病毒样颗粒表面抗原密度确定: 转肽反应结束后, 取样经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 (Coomassie blue R250)染色、脱色后, 电泳结果经天能凝胶成像系统拍照, 利用 ImageJ 软件, 对 HBc 和 AD-4

的转肽产物条带的灰度进行测定, 计算转肽比例。

ELISA 结果利用 GraphPad Prism 6.0 软件统计分析并绘制图表。各组间比较采用 One-way ANOVA 检验法, 数据表示为平均值±标准偏差。 $P>0.05$ 时认为没有显著性差异, $P<0.05$ 时认为有显著性差异(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

2 结果和分析

2.1 蛋白表达与纯化

将 pET28a-HBc、pET28a-Sortase A、pET28a-AD-4 重组载体分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中后, 挑取单菌落, 在 LB 培养基中培养, 经 IPTG 在 25 °C 低温诱导后, 离心收集菌体, 菌体经超声破碎后按相应的方法分别纯化 AD-4、Sortase A、HBc 蛋白(图 1 仅给出最终的纯化结果)。如图 1 所示, 三种蛋白均成功表达。经 SDS-PAGE 分析, AD-4 镍离子柱亲和层析纯化获得的目的蛋白大小为 16 kDa。采用蔗糖密度梯度离心法纯化相应蛋白时, 蔗糖密度梯度溶液会形成连续浓度梯度, 图 1 中用灰色的直角三角形表示蔗糖的浓度梯度, 浓度为 10%–50%, 灰色越深代表蔗糖浓度越高, 按照密度从低到高的顺序, 依次取样, 每次从超离管中取 1 mL, 标号 1–12 号, 再从 1–12 号管中取出适量蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测。实验发现, Sortase A 主要存在于低蔗糖密度的 1–4 号组分中, 分子量 25 kDa, 聚合形式的 Sortase A 蛋白因为密度较大, 则存在于高蔗糖密度的 6–9 号组分中。基于我们之前的研究^[13], 由于普通的 HBc 病毒样颗粒不能将 LPETGG 末端暴露在表面, 所以采用断裂 HBc 蛋白进行实验, 即在 HBc 的免疫显性的 c/e1 环区插入氨基酸序列 LPETGG 以及终止密码

子, 将其氨基酸序列分成两部分, N 端第 1-79 位氨基酸称 N core-LPETGG, C 端第 80-183 位氨基酸称 C core, 断裂 HBc 蛋白仅氨基酸序列断裂开来, 表达后的 N core-LPETGG 和 C core 仍能自发组成病毒样颗粒^[14]。如图 1-C 所示, N core-LPETGG

大小约为 10 kDa, C core 大小约为 18 kDa, 且同时存在于高蔗糖密度的 7-10 号组分中, 表明 N core-LPETGG 和 C core 确实组装形成了 VLPs。经琼脂糖凝胶电泳, 发现断裂 HBc 能被溴化乙锭(EB)染色^[14], 表明 VLPs 结合上了宿主核酸。

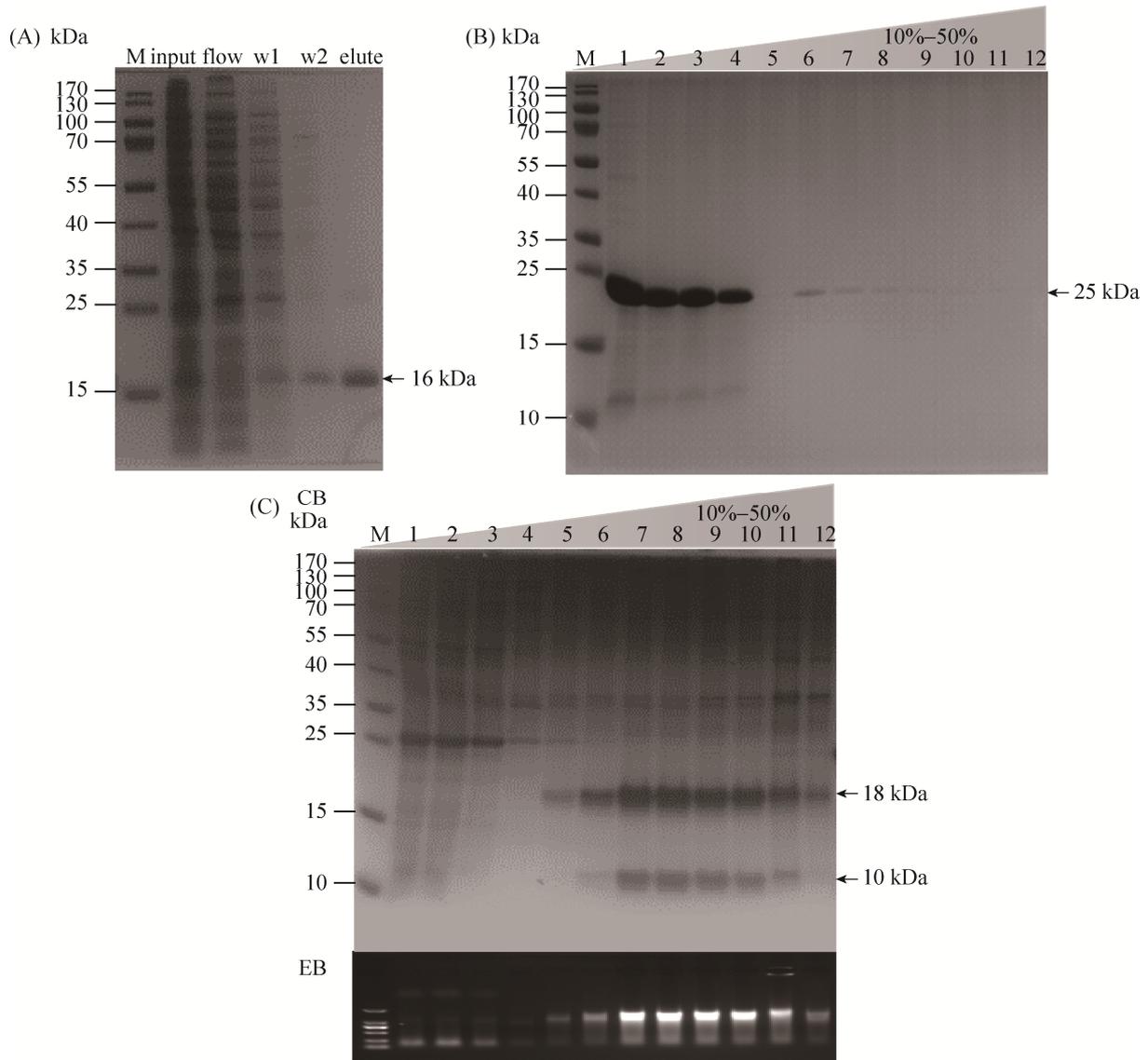


图 1. AD-4、Sortase A 和 HBc 蛋白的表达和纯化

Figure 1. AD-4, Sortase A and HBc protein expression and purification. SDS-PAGE analysis of purified AD-4 (A), Sortase A (B), HBc (C, CB) via Ni-NTA affinity chromatography. (C, EB) NAGE analysis was performed to monitor the sucrose gradient density ultracentrifugation separation of the target product. NAGE was stained with ethidium bromide (EB) 10%-50%: the concentration gradient of sucrose solution (W/V); M: protein marker; flow: flow through; w1: the first wash; w2: the second wash; 1-12: different fractions of the Sortase A and HBc sample after sucrose gradient density ultracentrifugation.

2.2 不同抗原密度的病毒样颗粒的确定

Sortase A 是一种转肽酶^[15], 它可特异性地识别 N core 上的暴露于 HBc 表面的 LPETGG 序列, 断裂 T 和 G 之间的肽键, 形成 N core-Sortase A 中间产物。而后 N 端带有 3 个甘氨酸的抗原 AD-4(本文涉及的 AD-4 蛋白, 均指 N 端带有 3 个甘氨酸的 AD-4)亲核攻击中间产物, 替换下 Sortase A, 进而与 N core 共价偶联, 生成转肽产物 N core-AD-4^[13], 由于断裂 HBc 的 N core 和 C core 仍能自发组装成病毒样颗粒的结构^[15], 这样就可以实现在 VLPs 表面展示不同密度的外源。我们已发表的工作^[13]发现, 当抗原浓度为抗体浓度的 6 倍时, 再增加抗原浓度, 转肽反应的效率不再明显提升。另外, 当 AD-4 的量过少时, 会导致生成的转肽产物 N core-AD-4 过少, SDS-PAGE 难以检测到条带。因此, 本研究设定了 7 组不同浓度 HBc 和 AD-4 的反应体系, 即 HBc 浓度 : AD-4 浓度分别为 1 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6。之后, 我们用考马斯亮蓝对 SDS-PAGE 结果进行染色, 脱色后, 用 ImageJ 软件分析转肽产物 N core-AD-4

的灰度值。如图 2-A, 转肽产物 N core-AD-4 的大小为 26 kDa, 我们发现随着 AD-4 浓度的增加, N core-AD-4 的生成量也呈现出增加的趋势, 表明 HBc-AD-4 病毒样颗粒表面的 AD-4 抗原密度也在增加。我们将 HBc 浓度 : AD-4 浓度=1 : 6 时的 VLPs 抗原密度定义为 100%密度, 即一个 VLPs 上的 LPETGG 位点全部被 AD-4 占据; 其余组别分别用相应转肽产物 N core-AD-4 的灰度值除以 1 : 6 组别的灰度值, 从而求得相对抗原密度的比例。HBc 浓度 : AD-4 浓度是 1 : 0.5 至 1 : 6 的 7 个实验组的抗原密度分别为 44.4%、64.2%、75.0%、79.6%、84.7%、95.0%、100%。如图 2-B 所示。之后按此比例放大至 2 mL, 以制备不同抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs。

2.3 不同抗原密度的病毒样颗粒的制备

配制 7 个转肽反应体系, 分别加入 HBc 蛋白、Sortase A 蛋白以及 AD-4 蛋白, 最后加入 CaCl₂ 作为催化剂, 体系不足 2 mL 的用 NT buffer 补齐。室温反应 2 h 后进行蔗糖密度梯度离心, 按照密度从低到高的顺序, 依次取样, 进行 SDS-PAGE 检测。如图 3 所示, 转肽产物 N core-AD-4 大小约

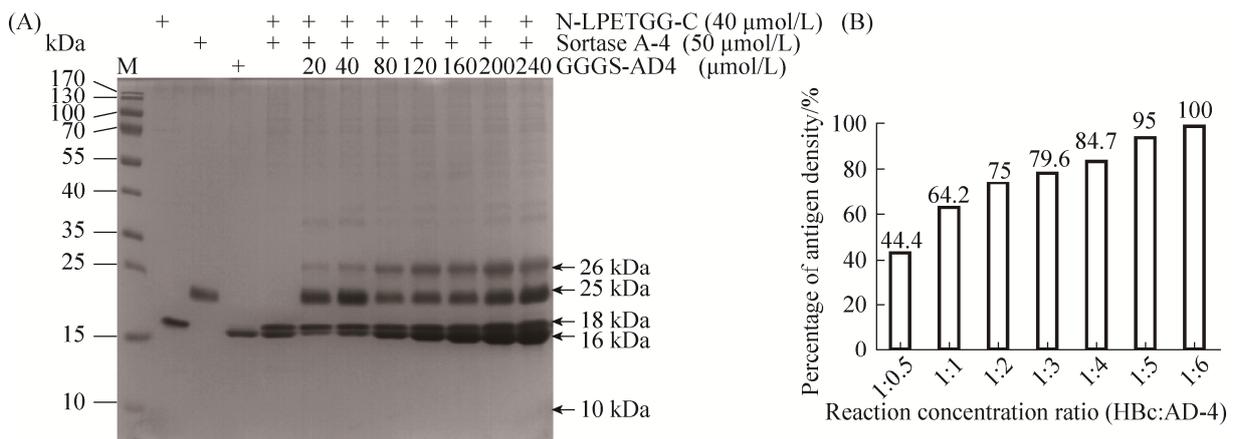


图 2. 确定病毒样颗粒表面的抗原密度

Figure 2. Determination of the antigen density of HBc-AD-4 VLPs. A: Sortase A ligated 20–240 $\mu\text{mol/L}$ (lanes 6–12) AD-4 antigen to HBc VLPs; B: Percentage of antigen density determined by SDS-PAGE and ImageJ software. M: protein marker.

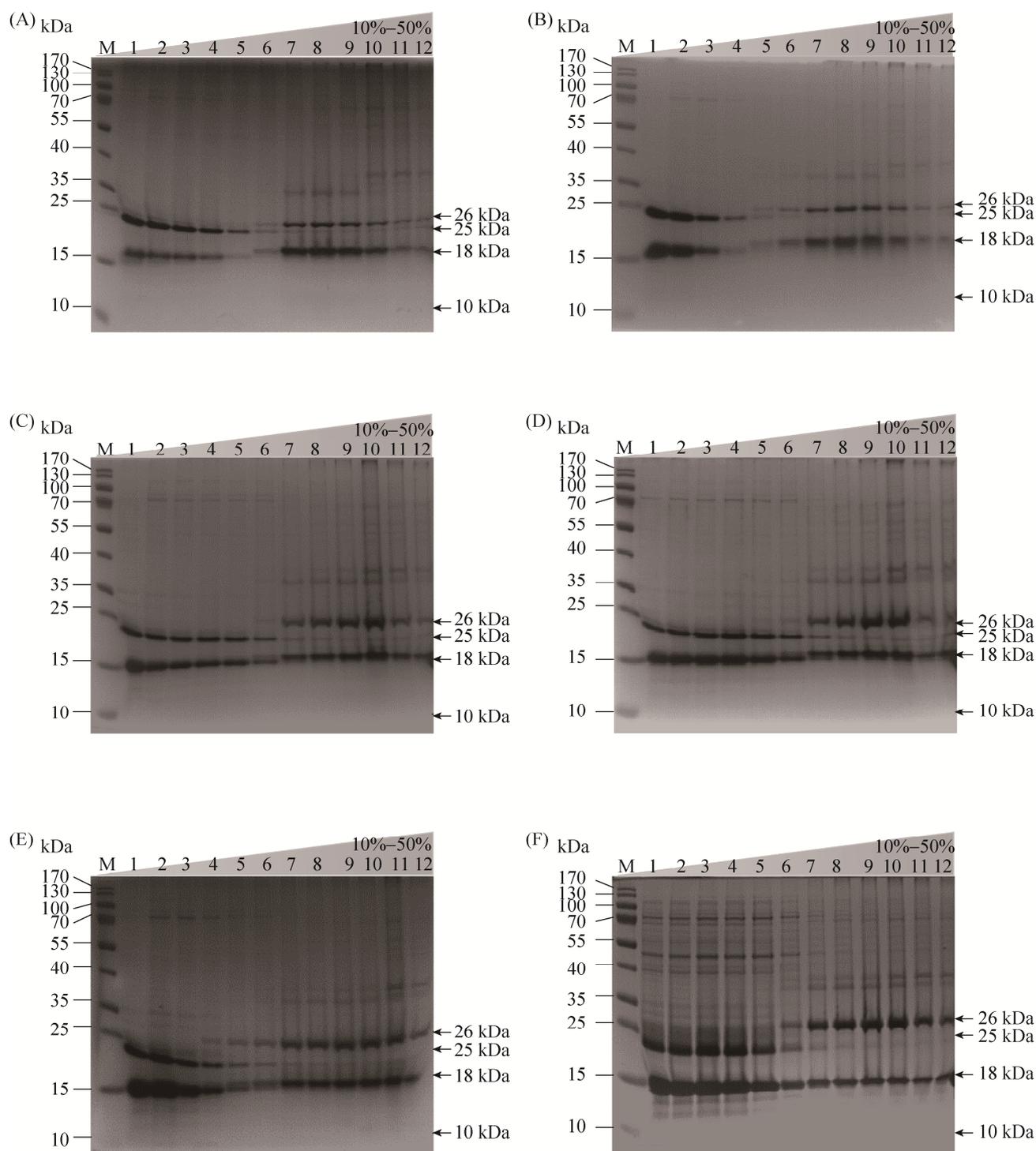


图 3. 不同抗原密度的病毒样颗粒的制备

Figure 3. Preparation of different antigen densities of HBc-AD-4 VLPs. A to F is 64.2%–100% antigen density of HBc-AD-4 VLPs. M: protein marker; lane 1–12: different fractions of the HBc sample after sucrose gradient density ultracentrifugation.

26 kDa, C core 大小仍约为 18 kDa。转肽产物 N core-AD-4 均主要分布在 7-10 号的组分中, 表明虽然 VLPs 表面抗原密度不同, 但是对 VLPs 粒子整体的密度大小并未产生明显影响。另外, 随着 AD-4 浓度的增加, 转肽产物 N core-AD-4 的生成量也呈现出增加的趋势, 表明不同抗原密度的 HBc-AD-4 VLPs 已成功制备。由于在 44.4% 抗原密度时 VLPs 中包含的 N core-AD-4 非常少, SDS-PAGE 难以检测到条带, 故 44.4% 抗原密度的 VLPs 制备结果没有给出。制备结束, 收集好含有相对纯净的转肽产物的组分, 在 PBS 中透析过夜, 以除去蔗糖。之后使用蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 最后放于 -80°C 冰箱冻存。

2.4 免疫小鼠的抗体应答

为了探索不同抗原密度病毒样颗粒对抗体滴度的影响, 设定 PBS、HBc 病毒样颗粒 2 个阴性对照组, 设置 7 个实验组, HBc 浓度 : AD-4 浓度分别为 1 : 0.5 至 1 : 6 (如 1.2.2 蛋白转肽反应体系的配制中所述), 每隔 2 周对小鼠接种 1 次, 共接种 3 次。采集血浆后, 使用间接 ELISA 的方法检

测血清中 AD-4 特异性抗体滴度, 采取终点 ($OD_{450}>0.2$) 读值法确定抗体的滴度。小鼠在初次免疫后即可发现 AD-4 抗体转阳, 如图 4-A 所示, 在 HBc 浓度 : AD-4 浓度为 1 : 5 时, 抗体滴度最高, 为 $10^{3.8}$, 与 HBc 对照组差异极显著 ($P<0.001$); 其次为 1 : 2 组别, 抗体滴度为 10^3 , 与 HBc 对照组有显著性差异 ($P<0.05$); 而其余实验组组别与 HBc 对照组均没有明显差异 ($P>0.05$, 用 n.s. 表示) (图 4-A 中仅标出 HBc 与实验组 1 : 0.5、1 : 2、1 : 5 组别的统计学关系)。二次加强过后, 所有组别小鼠产生的抗体应答水平有所升高。其中, 7 个实验组的抗体滴度均极显著高于 HBc 对照组 ($P<0.001$), 然而 1 : 0.5 实验组抗体滴度相对较低, 为 $10^{3.03}$, 与滴度最高的组别 1 : 4 (抗体滴度为 10^4) 存在显著性差异 ($P<0.05$) (图 4-B 中仅标出 HBc 与实验组 1 : 0.5、1 : 4 组别的统计学关系)。第三次免疫过后, 7 个实验组的抗体滴度仍然极显著高于 HBc 对照组 ($P<0.001$), 1 : 0.5 组别抗体水平略有上涨但抗体滴度仍然较低, 为 $10^{3.42}$, 其余实验组别抗体滴度也均有所升高, 1 : 1 至 1 : 6 的 6 个实验组间抗体滴度无明显差异 ($P>0.05$), 其中 1:2 组别抗体滴度最高, 为 $10^{4.65}$,

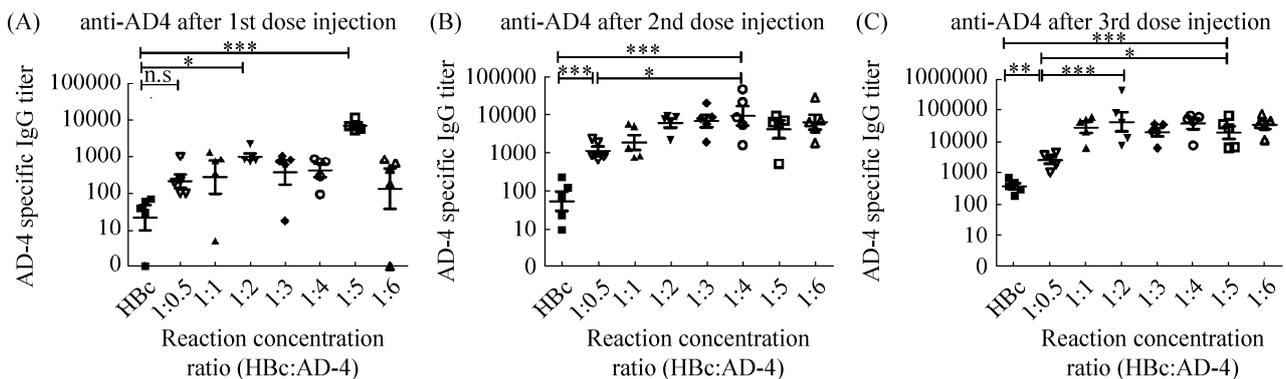


图 4. 抗体滴度的测定

Figure 4. Endpoint titer of AD-4 specific antibodies of all the 7 different antigen density groups and two control groups (PBS and HBc groups) which were measured at days 14 (A), 28 (B) and 42 (C). (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; n.s., no significant difference).

其中 1:5 组别抗体滴度最低, 为 $10^{4.3}$ 。1:2 抗体滴度极显著高于 1:0.5 组别($P < 0.001$), 而 1:5 组别抗体滴度也显著高于 1:0.5 组别($P < 0.05$)。以上结果表明, HBc VLPs 表面抗原密度确实对免疫后特异性抗体滴度存在影响; 当 HBc 表面抗原密度为 44.4% 时, 即 HBc 浓度 : AD-4 浓度为 1:0.5 时, 不足以引起高滴度的抗体产生; 当 HBc 表面抗原密度为 64.2% 时, 即 HBc 浓度 : AD-4 浓度为 1:1 时, 病毒样颗粒诱导的特异性抗体滴度与展示高密度抗原的 VLPs 所引起的抗体滴度相当; 抗原密度大于 64.2% 时, 引起的抗体应答水平不因抗原密度增加而显著变化。

3 讨论

已有研究表明, 抗原展示于纳米颗粒表面的疫苗更利于加强体液免疫应答^[1, 12, 16]。但是, 纳米颗粒疫苗表面抗原密度对免疫应答的影响缺乏相关的研究^[2]。曾有报道用二硝基苯半抗原交联的聚丙烯酰胺、鸡卵溶菌酶修饰的羊红血球以及联合抗原和佐剂研究抗原密度对宿主免疫反应的影响^[11-12, 17]。也有实验表明, 利用生物素-链霉亲和素系统交联抗原蛋白的聚苯乙烯纳米颗粒疫苗, 低密度的抗原比高密度的抗原更有效地活化 B 细胞, 诱导更高水平的体液免疫应答^[8]。表明纳米颗粒表面的抗原密度对于体液免疫反应的引发是至关重要的。

在本研究中, 我们以更加接近天然病原体的病毒样颗粒为实验材料, 对这一关键问题作了进一步研究和探讨。我们利用转肽酶 Sortase A 介导的转肽功能, 通过调节抗原表位底物浓度, 将不同密度的 AD-4 抗原展示至 HBc VLPs 表面。实验结果表明, 与已经报道的聚苯乙烯纳米颗粒疫苗不同, 基于 HBc 的病毒样颗粒疫苗诱导的抗体滴

度与其表面抗原密度存在相关性, 但是在达到一定的抗原密度后所诱导产生的抗体滴度趋于饱和, 即继续提高抗原密度不能诱导更强的抗体反应。具体的, 44.4% 抗原密度的 VLPs 不能引起较高水平的抗体滴度, 64.2% 至 100% 抗原密度的 VLPs 能够诱导产生相当的较高的抗体滴度, 且此时诱导产生的抗体滴度与 VLPs 表面抗原密度无关。该发现将为开发病毒样颗粒疫苗提供理论指导。

至于纳米颗粒表面的抗原密度是如何影响免疫反应的还有待进一步研究。我们推测有可能纳米颗粒表面的抗原蛋白密度影响了定居在免疫位点和引流淋巴结的免疫细胞对抗原的获取和处理。另外也有可能是 B 细胞表位在纳米载体低密度展示的情况下变得更容易被利用, 因此容易引发更强的抗原特异性反应, B 细胞受体可能会通过对信号的放大增强辅助性 T 细胞的效力^[18-19]。遗憾的是, 我们在试验中发现免疫不同 AD-4 抗原密度的 HBc VLPs 小鼠的抗血清对于 HCMV 没有中和活性, 这可能是本实验系统的一个缺陷, 后续的实验将在如何提升不同密度病毒样颗粒所诱导的中和抗体活性方面做进一步研究。

参考文献

- [1] Sliepen K, Ozorowski G, Burger JA, van Montfort T, Stunnenberg M, LaBranche C, Montefiori DC, Moore JP, Ward AB, Sanders RW. Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity. *Retrovirology*, 2015, 12: 82.
- [2] Kumar S, Anselmo AC, Banerjee A, Zakrewsky M, Mitragotri S. Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 2015, 220: 141-148.
- [3] Benson RA, MacLeod MK, Hale BG, Patakas A, Garside P,

- Brewer JM. Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *eLife*, 2015, 4: e06994.
- [4] Mahmood K, Bright RA, Mytle N, Carter DM, Crevar CJ, Achenbach JE, Heaton PM, Tumpey TM, Ross TM. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Vaccine*, 2008, 26(42): 5393–5399.
- [5] Wynne SA, Crowther RA, Leslie AG. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular Cell*, 1999, 3(6): 771–780.
- [6] Zhu P, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, 2006, 441(7095): 847–852.
- [7] Compans RW, Klenk HD, Caliguirri LA, Choppin PW. Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*, 1970, 42(4): 880–889.
- [8] Brewer MG, DiPiazza A, Acklin J, Feng CY, Sant AJ, Dewhurst S. Nanoparticles decorated with viral antigens are more immunogenic at low surface density. *Vaccine*, 2017, 35(5): 774–781.
- [9] Vlasak J, Hoang VM, Christanti S, Peluso R, Li FS, Culp TD. Use of flow cytometry for characterization of human cytomegalovirus vaccine particles. *Vaccine*, 2016, 34(20): 2321–2328.
- [10] Plotkin S. The history of vaccination against cytomegalovirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 2015, 204(3): 247–254.
- [11] Dintzis RZ, Middleton MH, Dintzis HM. Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *The Journal of Immunology*, 1983, 131(5): 2196–2203.
- [12] Moon JJ, Suh H, Li AV, Ockenhouse CF, Yadava A, Irvine DJ. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand T_H cells and promote germinal center induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1080–1085.
- [13] Tang SB, Xuan BQ, Ye XH, Huang Z, Qian ZK. A modular vaccine development platform based on sortase-mediated site-specific tagging of antigens onto virus-like particles. *Scientific Reports*, 2016, 6: 2541.
- [14] Walker A, Skamel C, Nassal M. SplitCore: an exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure. *Scientific Reports*, 2011, 1: 5.
- [15] Popp MWL, Ploegh HL. Making and breaking peptide bonds: Protein engineering using sortase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50(22): 5024–5032.
- [16] Galloway AL, Murphy A, de Simone JM, Di J, Herrmann JP, Hunter ME, Kindig JP, Malinoski FJ, Rumley MA, Stoltz DM, Templeman TS, Hubby B. Development of a nanoparticle-based influenza vaccine using the PRINT® technology. *Nanomedicine*, 2013, 9(4): 523–531.
- [17] Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203(4): 1081–1091.
- [18] Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (T_{FH}). *Annual Review Immunology*, 2011, 29(1): 621–663.
- [19] Jegerlehner A, Storni T, Lipowsky G, Schmid M, Pumpens P, Bachmann MF. Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *European Journal of Immunology*, 2002, 32(11): 3305–3314.

Correlation between antigen density on the surface of hepatitis B virus core protein virus-like particles and their antibody response

Qi Li^{1,2}, Shubing Tang², Shumin Zhou¹, Zhikang Qian^{2*}

¹School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200000, China

²CAS Key Laboratory of Molecular Virology & Immunology, Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200000, China

Abstract: [Objective] To better understand how antigen density on the surface of hepatitis B virus core protein (HBc) virus-like particles (VLPs) affects their antibody response, we generated HBc VLPs with different antigen densities, and tested their antibody response in mice. [Methods] First, we prepared the recombinant antigen domain 4 (AD-4) of human cytomegalovirus (HCMV) as a model antigen, which contains three glycine molecules at its N-terminus, for Sortase A-mediated ligation onto the HBc VLPs. Displaying different densities of antigens onto the surface of VLPs was achieved by using a serial diluted recombinant AD-4 in ligation reactions. After that, HBc-AD-4 VLPs with different antigen densities were applied to 6–8 weeks old BALB/c mice. Each group was inoculated three times at 2-week intervals and the AD-4-specific IgG was detected by indirect ELISA. [Results] When the reaction concentration ratio between HBc and AD-4 is 1:0.5, which HBc surface antigen density is 44.4%, VLPs couldn't induce a high antibody titer. When the reaction concentration ratio between HBc and AD-4 is 1:1, which HBc surface antigen density is 64.2%, VLPs could induce similar highest humoral immune response compared to 100% antigen density HBc VLPs. When HBc surface antigen density is greater than 64.2%, no further enhancement of antibody response was observed by further increasing the antigen density. [Conclusion] In conclusion, we found that antigen density on HBc VLPs is positively correlated with the antibody response. However, it reaches a peak at 64% antigen density, and no further enhancement of antibody response was observed by further increasing the antigen density.

Keywords: virus-like particles, antigen density, humoral immune response, hepatitis B virus core protein, sortase A

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81572002) and by the National Key Research and Development Plan (2016YFA0502101)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923105; E-mail: zkqian@ips.ac.cn

Received: 3 April 2018; Revised: 25 June 2018; Published online: 18 September 2018