

LASV 糖蛋白复合物纳米颗粒的构建及功能性验证

Construction and functional validation of LASV glycoprotein complex nanoparticles

生命科学学院 赵星义 Xingyi Zhao

指导教师 王鹏飞 Pengfei Wang

摘要：西非地区目前正在经历拉沙热(Lassa fever)的大规模疫情，而更严重的是，拉沙热的流行范围似乎还在不断扩大。然而，目前还没有针对拉沙热的特效药物和疫苗，因此迫切需要研发高效且特异的抗拉沙病毒(LASV)药物。作为唯一可被中和抗体识别的抗原，LASV 表面 I 型融合糖蛋白复合物三聚体(GPC trimer)自然成为了目前疫苗研发的主要焦点。新冠疫情期间，以 SpyTag/SpyCatcher 系统为基础的纳米颗粒(Nanoparticle, NP)构建技术已在重组蛋白疫苗开发中得到开发与应用。基于此，本课题试图构建基于 LASV GPC trimer 的纳米颗粒疫苗，并验证其相较于 GPC trimer 单体更强的抗原性。我们通过重叠延伸 PCR 和无缝克隆技术构建 GPC trimer-SpyTag 表达载体，将其转入哺乳动物表达系统中进行表达，之后通过 Strep-tag 系统纯化。此外，我们将 Scaffold-SpyCatcher 表达载体转入原核表达系统进行表达，并通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。在体外条件下，完成 GPC trimer-SpyTag 和 Scaffold-SpyCatcher 的自组装，随后通过 SEC 进行纯化。最后，我们利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测该抗原偶联纳米颗粒的抗原性，并得到符合预期的初步结果。本课题构建的具有抗原性且稳定的 GPC trimer 偶联纳米颗粒为后续疫苗制备和中和抗体分离提供抗原基础。

关键词：LASV；GPC trimer；纳米颗粒构建；功能性验证

Abstract: West Africa is currently experiencing a large-scale outbreak of Lassa fever, which, more seriously, appears to be growing in scope. However, there is no specific drug or vaccine against Lassa fever, so there is an urgent need to develop highly effective and specific anti-Lassa virus (LASV) drugs. As the only antigen recognised by neutralising antibodies, the LASV surface type I fusion glycoprotein complex trimer (GPC trimer) is naturally the main focus of current vaccine development. Nanoparticle (NP) construction technology based on the SpyTag/SpyCatcher system has been developed and applied in recombinant protein vaccine development during the coronavirus disease pandemic of 2019. Based on this, in this work, we tried to construct a nanoparticle vaccine based on LASV GPC trimer and validate its stronger antigenicity compared to GPC trimer monomer. We constructed the GPC trimer-SpyTag expression vector by overlap extension PCR and seamless cloning, transferred it into mammalian expression system for expression, and later purified it by Strep-tag system. In addition, we transferred the Scaffold-SpyCatcher expression vector into a prokaryotic expression system for expression and

purified by Ni-NTA affinity chromatography. Self-assembly of GPC trimer-SpyTag and Scaffold-SpyCatcher was accomplished under in vitro conditions and subsequently purified by SEC. Finally, we tested the antigenicity of the antigen-coupled nanoparticles using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and obtained preliminary results in line with expectations. The antigenic and stable GPC trimer-coupled nanoparticles constructed in this work provide the antigenic basis for subsequent vaccine preparation and neutralising antibody isolation.

Keywords: LASV; GPC trimer; Construction of GPC trimer NP; functional validation

引言

拉沙热(Lassa fever)是一种由拉沙病毒(Lassa virus, LASV)引起的主要在西非流行的急性病毒性出血热, 目前已在整个西非暴发过多次不同规模和严重程度的疫情。据估计, 每年约有 10-30 万人感染, 5000 多人死亡, 幸存者也常伴有耳聋等严重后遗症。更为严重的是, 拉沙热的流行范围似乎正在不断扩大。然而, 目前针对拉沙热的治疗手段非常有限, 主要依赖于患病早期使用广谱抗病毒药物利巴韦林, 但其疗效存在不确定性。因此, 开发高效且特异的抗 LASV 药物和疫苗显得尤为迫切。

LASV 属沙粒病毒科(Arenaviridae), 哺乳类沙粒病毒属(Mammarenavirus), 其基因组由两个节段的负链 RNA 组成, 通过双义编码策略表达四种已知的病毒蛋白。其中, 病毒包膜表面的 I 型融合糖蛋白复合物三聚体(GPC trimer)是 LASV 表面的唯一抗原, 也是唯一可被中和抗体识别的抗原。^[1]GPC 由一个与宿主细胞表面受体结合的 GP1 亚基、一个跨膜的 GP2 亚基和一个稳定结构相关的信号肽(SSP)共价连接组成, 并在病毒粒子表面以三聚体形式聚集。^{[2][3]}

尽管目前的研究已对 GPC trimer 的结构有了深入的了解, 但在 GPC trimer 的实际制备过程中仍面临诸多挑战。例如, GP1 和 GP2 之间的分离倾向和 GP2 进入六螺旋束构象的倾向而导致无法得到稳定的结果。为了解决这些问题, 研究人员采用了包括“半胱氨酸连接策略”^{[4][5]}和位点突变^[6]等多种方法, 以提高 GPC trimer 的稳定性。

而纳米颗粒疫苗因其稳定性和递送机制, 被认为是一种可行的疫苗研制思路,^[7]目前正受到病毒防控领域的广泛关注。在构建纳米颗粒疫苗的策略中, SpyCatcher/SpyTag 系统是一种常用手段。SpyCatcher/SpyTag 系统是一种基于化脓链球菌纤连蛋白结合蛋白的 CnaB2 结构域改造而来的肽/蛋白质偶联工具, 能够高亲和力和力地彼此识别并自发形成异肽键, 把病原体的抗原结构和其他颗粒组装到一起, 成为“定制化抗原”, 甚至把多种抗原融合在一起^{[8][9]}, 为构建自组装纳米颗粒提供了一种快速、可靠且不可逆的方法^{[10][11]}。已在例如防治 SARS-CoV-2 的疫苗开发中得到应用。^{[12][13]}

根据上述已有研究成果, 本课题试图以 I53-50A/B-SpyCatcher、Ferritin-SpyCatcher 和 mi3-SpyCatcher 为骨架蛋白(Scaffold-SpyCatcher), 通过 SpyCatcher/SpyTag 系统偶联两种毒

株(GA391 和 KAK-428)的 GPC trimer-SpyTag 蛋白, 在体外条件下形成稳定且具有强抗原性的抗原偶联纳米颗粒, 为后续疫苗制备和中和抗体分离提供抗原基础。

1. 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂与耗材

2× Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)(Vazyme); CelRed(10000×) 核酸染料 (CR001, LABELAD); DNA Marker (B500350, 生工); 胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit D2500, Omega); Seamless cloning Master Mix (B632219, 生工); DH5α感受态细胞(#CC96102, TOLOBIO); 质粒大提试剂盒(Endo-Free Plasmid Maxi Kit D6926, Omega); SMM 293-TII 培养基(M293TII, Sino Biological); OPM-293 CD05 Medium (OPM); OPM-293 ProFeed (OPM); Opti-MEM 减血清培养基(货号: 31985-070, Gibco); PEI (26008, Polysciences); Rosetta 感受态细胞(#CC96109, TOLOBIO); Ni-NTA 6FF (His-Tag)蛋白琼脂糖纯化树脂(C600033, 生工); Streptaction Beads (STarm Sterptaction Beads 4FF, 天地人和); 超滤管(10k & 50k, millipore); 96 孔深孔板(BIOFIL); 酶标板(F605031, 生工); 人源抗 GPC trimer 抗体 37.7H (由课题组其他人员表达); HRP 标记山羊抗人 IgG (D110150, 生工); TMB 显色液(ELISA HRP 显色用)(P0209, 碧云天); TMB 显色终止液(450 nm, 不含硫酸)(P0215, 碧云天)。

1.1.2 实验仪器

PCR 仪; 电泳仪; 电泳槽; 凝胶成像仪; Nanodrop 微量分光光度计(ThermoFisher); 超净工作台; 自动细胞计数器(AMQAX2000, Life Technologies); 超声细胞破碎仪; AKTA 自动纯化系统; 体积排除色谱柱(Superose 6 Increase 10/300GL, 24 mL); 高性能多功能微孔板检测仪(Synergy 2, BioTek)。

1.2 实验方法

1.2.1 重叠延伸 PCR

通过设计引物进行重叠延伸 PCR 并线性化质粒载体, 对 LASV GPC trimer 原始序列进行 4 处点突变优化(K207GC, LL258RR, L326C & E329P), 同时使得 LASV GPC trimer 序列两端存在与预设质粒载体(pCAGGS)两端 15-20 bp 相同的序列, 用于后续的无缝连接实验。

引物设计如下:

引物名称	序列 (5'→3')
GA391-F1	CCGAGTTCGGTACCGCCACCATGGGCCAGATCGTGACCTTC
GA391-R1	GCCGCAGCCGCCAGAGTCCAGGGCGATGTA
GA391-F2	GCCCTGGACTCTGGCGGCTGCGGCAACTGGGATTGTAT
GA391-R2	CCAGGTGAAGGTGCCACGTCTTCTCCGGGAGATATAGATGT

GA391-F3	CTCCCGGAGAAGACGTGGCACCTTCACCTGGACACT
GA391-R3	TCATCTGGGCGGGTGTCTTGCAGCGCCTGATGGCCTGCTTG
GA391-F4	GCAGGCCATCAGGCGCTGCAAGACACCCGCCAGATGAGCATCC
GA391-R4	GGGCCTCGGGGATGTATCCGGATCCATCCACCAGTCCCAGTGGGGTC
引物名称	序列 (5'→3')
KAK428-F1	CCGAGTTCGGTACCGCCACCATGGGCCAGATCGTGACCTTC
KAK428-R1	CCTCTGCAGCCGCCGGAGTCCAGGGCCAGGTAGCT
KAK428-F2	GCCCTGGACTCCGGCGGCTGCAGAGGATGGGATTGTAT
KAK428-R2	CCATGTGAAGGTGCCCGTCTGCGCCTGGAGATATAGATGT
KAK428-F3	GGCGCAGACGGGGCACCTTCACATGGACCCTGAGCGACT
KAK428-R3	GTTTCATCTGGGCGGGGCCTTGCATCTCTGGATGGCCTGCTTG
KAK428-F4	GCAGGCCATCCAGAGATGCAAGGCCCGCCAGATGAACATCCAG
KAK428-R4	GGGCCTCGGGGATGTATCCGGATCCATCCACCAGTCCCAGTGGGGTC
引物名称	序列 (5'→3')
pCAGGS-F	GGTGGCGGTACCGAACTCGGC
pCAGGS-R	GGATCCGGATACATCCCCGAGGCC

1.2.2 无缝克隆实验

将目的 DNA 片段和线性化载体以一定的摩尔比 (2:1-3:1) 加入 PCR 管中, 然后加入 10 μ L 2 \times Seamless cloning Master Mix, 并使用 ddH₂O 补齐至 20 μ L, 置于 PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 反应 20 min。反应结束后, 立即将离心管置于冰上冷却 2 min, 待转化。

1.2.3 DH5 α 克隆感受态细胞转化与质粒大提

取 10 μ L 无缝克隆产物加入到 100 μ L 冰上化冻的 DH5 α 感受态细胞中混匀, 冰上静置孵育 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 s, 随后立即转移至冰水浴中静置 2-3 min。经复苏培养后将菌液涂布至 Amp⁺ LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12-16 h 后观察转化情况。

1.2.4 IPTG 诱导原核蛋白诱导表达

取 10 μ L 无缝克隆产物加入到 100 μ L 冰上化冻的感受态细胞中混匀, 冰上静置孵育 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 s, 随后立即转移至冰水浴中静置 2-3 min。将菌液全部涂布于 Kan⁺ Chloramphenicol⁺ TB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12-16 h。之后挑取单克隆, 37 $^{\circ}$ C, 220 rpm 过夜小摇后保种, 取样送公司测序。测序正确的菌液重新化冻过夜小摇, 之后 37 $^{\circ}$ C, 220 rpm 大摇至 OD600 值达到 0.6-0.8, 向菌液中加入终浓度 1 mM 的 IPTG, 18 $^{\circ}$ C, 220 rpm 摇菌 16-20 h 诱导表达。

1.2.5 HEK293F 细胞培养与转染

HEK293F 细胞经细胞复苏培养后可进行传代。使用自动细胞计数器统计传代前细胞密度, 并以 1.5×10^6 /mL 为传代后细胞密度, 取细胞液加入适量混合培养基 (SMM 293-TII 培

培养基和 OPM-293 CD05 Medium 按体积比 1:1 混匀), 37°C, 130 rpm 5% CO₂ 摇床培养 3 d 后进行下一次传代。

以 100 mL 转染体系为例, 离心管中加入体积比 10%的 opti-MEM (10mL); 100 μL 质粒和 300 μL PEI, 吹打混匀后, 静置 15-20 min。自动细胞计数器统计待使用细胞的密度, 根据细胞密度预设的转染体系, 加入适量细胞液; 10 mL 转染溶液和混合培养基, 使得转染体系中细胞初始浓度为 2.5×10^6 /mL, 37°C 130 rpm 5% CO₂ 摇床培养。第二天加入体积比 10% 的 OPM-293 ProFeed, 继续培养 4 d。

1.2.6 Ni-NTA 亲和层析

取少量诱导表达后浓缩的菌液, 加入裂解/上样 Buffer 稀释混匀后, 在冰水浴条件下超声破碎菌体, 裂解液 4°C 12000 ×g 离心 30 min, 0.45 μm 滤膜过滤上清后作为样品液。取装有滤芯的层析柱和 Ni-NTA 琼脂糖填料, 向装有滤芯的层析柱中加入适量 Ni-NTA 琼脂糖填料, 裂解/上样 Buffer 平衡层析柱后加入样品液过柱吸附, 裂解/上样 Buffer 洗涤填料。加入 10 mL 洗脱 Buffer 进行洗脱, 以 1 mL 为单位收集洗脱液, 用于检测蛋白表达与纯化情况。选择蛋白含量和纯度较高的洗脱液, 使用 10k 超滤管 4°C, 4500 rpm, 离心 10 min 进行浓缩, 并用 Nanodrop 测定蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 检测纯化情况。收集得到的蛋白溶液保存于 -80°C。向洗脱完蛋白的柱中加入约 30 mL 终洗脱 Buffer 进行终洗脱, 再用约 30 mL 1× PBS 洗涤填料, 最后用约 30 mL 20%乙醇洗涤填料后, 回收填料并保存于 20%乙醇中, 置于 4°C 冰箱中。

各缓冲液配置如下:

- (1) 裂解/上样 Buffer: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 7.3
- (2) 洗脱 Buffer: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7.3
- (3) 终洗脱 Buffer: 300 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.3

1.2.7 Strep-tag 蛋白纯化系统

转染表达后的细胞液 4°C 4500 rpm 离心 10 min, 取上清作为样品液, 加入适量 Streptactin Beads 4°C 过夜摇床孵育。过夜孵育后的样品 4°C 1000 rpm 离心 3 min。吸去绝大部分上清, 留部分液体用于重悬 Beads。将 Beads 加入装有滤芯的层析柱中 1× PBS 清洗 Beads, 然后 15 mL 洗脱 Buffer 洗脱蛋白, 50k 超滤管浓缩蛋白溶液, 1× PBS 对蛋白溶剂进行置换。最后用 Nanodrop 测定蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 检测纯化情况。

洗脱 Buffer 配置: 1× PBS 中加入终浓度 5 mM D-生物素。

1.2.8 SEC 纯化蛋白

样品最大转速(>12000 rpm)离心 5 min 除去可能存在的颗粒杂质。

打开 AKTA 操作系统, 设置流速(Flow rate)为 10 mL/min, 先用 ddH₂O 冲洗系统, 再使用 1× PBS 润洗系统。降低流速至 0.75 mL/min, 设置柱前压限制(Pressure limit pre-column)为 2 MPa, 将色谱柱接入系统。将 1 mL 上样环(loop)接入系统, 用注射器向其中打入 >1 mL

的 1× PBS 以清洗上样环，之后缓慢地将样品打入 loop 环完成上样。将 96 深孔板放入收集箱，设置每孔接收 0.5 mL 洗脱液进行洗脱。

设置程序：Equilibration→Sample Application→Elution→Equilibration，各步骤详细设置如下：

- (1) Equilibration: 设置流速为 0.75 mL/min，平衡体积为一个柱体积 24 mL。
- (2) Sample Application: 设置流速为 0.75 mL/min，选择<inject sample from loop>，<Empty loop with>设置为 1 mL，<Fractionate>选择<in waste>。
- (3) Elution: 设置流速为 0.75 mL/min，<Isocratic elution>设置为 20 mL，<Fractionate>选择<using fraction collector>，<Fractionation type>选择<Fixed volume fractionation>，<Fractionation destination>选择<96 deep well plate>，<Fixed fractionation volume>选择 0.5 mL。

该程序运行完成后，观察峰图，确定各吸收峰对应的洗脱体积并收集相应蛋白液，10k 超滤管进行浓缩，并用 Nanodrop 测定蛋白浓度，通过 SDS-PAGE 检测纯化情况。

1.2.9 酶联免疫吸附试验 ELISA

- (1) 包被抗原：用 1× PBS 稀释测定好浓度的 GPC trimer monomer 和 GPC trimer NP 至 2 μg/mL。取酶标板，每孔加入 100 μL 蛋白液，4℃过夜孵育。设置 2 组重复实验。
- (2) 洗涤：弃包被液，200 μL PBST 洗涤酶标板 4 次，每次 2 min。
- (3) 封闭：每孔加入 200 μL 封闭液，37℃封闭 2 h。
- (4) 洗涤：操作步骤同上。
- (5) 结合一抗：用稀释液稀释人源抗 GPC trimer 抗体，从 40 μg/mL 开始，5 倍连续稀释。每孔加入 100 μL 对应稀释后的一抗，同时设置一组阴性对照（抗体浓度为 0），37℃孵育 1 h。
- (6) 洗涤：操作步骤同上。
- (7) 结合酶标二抗：用稀释液稀释 HRP 偶联山羊抗人 IgG 至合适浓度，每孔加入 100 μL，37℃孵育 1 h。
- (8) 洗涤：操作步骤同上。
- (9) 显色：每孔加入 100 μL TMB 显色液，室温避光显色 4 min。
- (10) 终止反应：待显色后，每孔加入 50 μL TMB 显色终止液，溶液颜色由蓝色变为黄色。
- (11) 读值：用酶标仪读取各孔 OD₄₅₀，确定抗原与抗体的结合能力。

各缓冲液配置如下：

- (1) 洗涤液 PBST: Tween-20 0.5 mL(体积比为 0.05%)，加 1× PBS 至 1000 mL。
- (2) 封闭液：脱脂奶粉 5 g(质量比为 5%)，BSA 0.5 g(质量比为 0.5%)，加 PBST 至 100 mL。
- (3) 稀释液: 将封闭液用洗涤液 2.5 倍稀释，如 20 mL 封闭液中加入 30 mL 洗涤液配成 50 mL 稀释液。

2. 实验结果

2.1 构建 GPC trimer-SpyTag 表达载体

本课题试图构建 pCAGGS-GPC trimer-SpyTag 质粒用于表达 GPC trimer-SpyTag 蛋白。各次重叠延伸 PCR 的产物片段如图 1A 所示。在每次重叠延伸 PCR 过后，通过胶回收得到纯净的 DNA 后进行下一次 PCR，最终得到高浓度的全长 GPC trimer-SpyTag 序列片段。之后，与线性化的载体 pCAGGS 进行无缝克隆实验和转化，37℃ 培养箱中倒置培养 12-16 h 后的平板照片如图 1B 和 1C 所示。结果显示，本课题中进行的重叠延伸 PCR、无缝克隆和转化实验结果符合预期，GPC trimer-SpyTag 表达载体构建正确。完整质粒图谱如图 1D 和图 1E 所示，主要表达蛋白 GA391-GPC-Foldon-linker-Strep tag，同时包含 ori, AmpR, CMV enhancer, chicken β -actin promoter, kozak sequence, β -globin poly(A) signal 等重要元件。

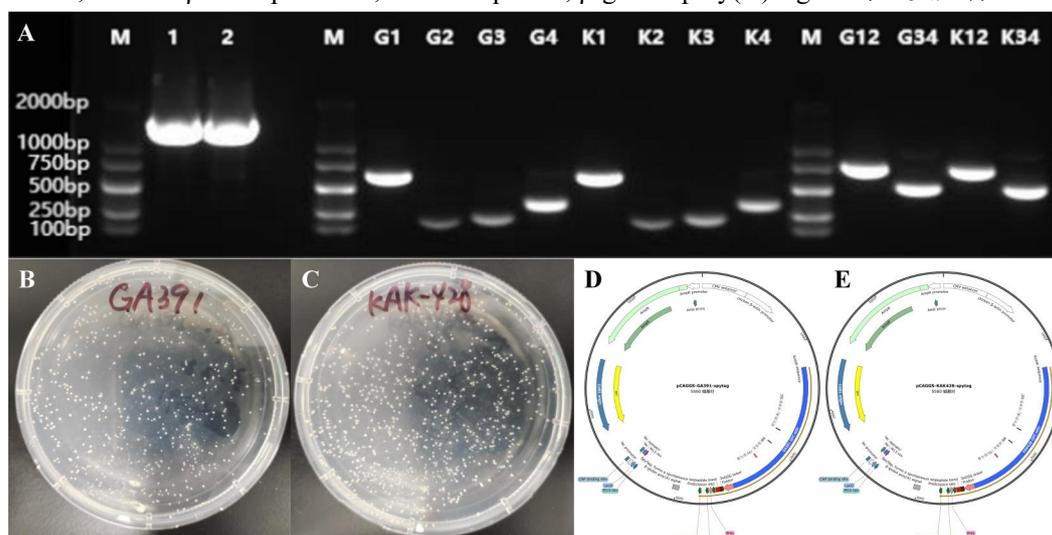


图 1 构建 GPC trimer-SpyTag 表达载体

A)重叠延伸 PCR 结果图，其中泳道 1 和 2 分别为 GA391 GPC trimer 全长片段和 KAK428 GPC trimer 全长片段；B)&C)质粒转化入 DH5 α 感受态细胞后过夜培养的平板照片；D)&E) pCAGGS-GPC trimer-SpyTag 质粒图谱。

2.2 纯化 GPC trimer-SpyTag 表达载体

从Amp⁺ LB平板上各挑取 3 个单菌落，分别记为g1、g2、g3 和k1、k2、k3。摇菌扩增后保种并测序，测序结果如图 2A和图 2B所示。

对测序结果符合预期的菌液(g1、g2、g3 和k1、k3)小摇扩增，再将培养体系提升至 200 mL 以便后续质粒大提。对大摇扩增的菌液进行质粒大提，获得较高浓度（约 300 ng/ μ L）的质粒用于后续的细胞转染实验，以表达GPC trimer-SpyTag蛋白。大提实验结果如图 2C所示。结果显示，通过摇菌扩增后大提所得质粒序列正确且浓度较高，可用于之后的转染实验。

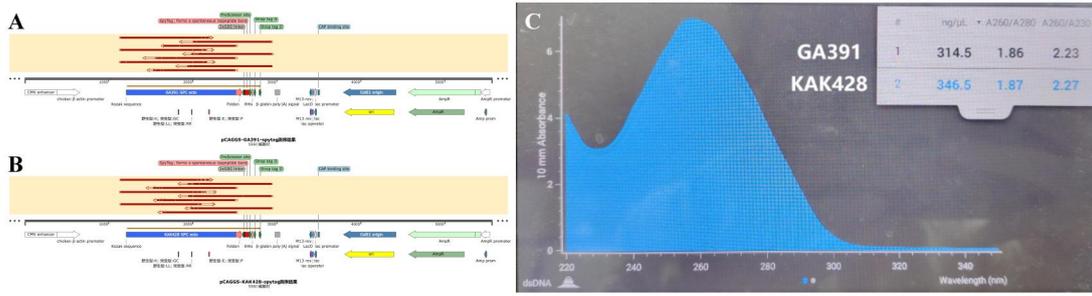


图2 纯化 GPC trimer-SpyTag 表达载体

A)&B) 2 种质粒的测序结果图，每个菌种由 3 条测序引物进行测序，从上到下分别为：PCAGGS-F、PCAGGS-R、Foldon-R，红色区域为匹配区段，上方白线为不匹配的碱基。结合测序的局限性，可以认为：g1、g2、g3、k1 和 k3 为未突变的正确的质粒；C) 分光光度计测定质粒浓度结果图，其中#1 为 pCAGGS-GA391-SpyTag 的浓度，#2 为 pCAGGS-KAK428-SpyTag 的浓度。

2.3 GPC trimer-SpyTag 的表达与纯化

将大提得到的质粒转染至 HEK 293F 细胞中，以表达 GPC trimer-SpyTag 蛋白。利用该蛋白上携带的 Strep tag 进行纯化，以得到较高浓度的 GPC trimer-SpyTag 蛋白。纯化结果如图 3 所示。

如图 3A 所示，GA391 的 GPC trimer-SpyTag 表达量可达毫克级（200 mL 转染体系，蛋白产率：0.750 mg/mL，约 1.5 mL）。如图 3B 的 SDS-PAGE 结果所示，其在还原性 SDS-PAGE 条件下跑出一条条带，条带在 70-100 kDa 之间，说明在蛋白纯化过程中该蛋白基本没有出现解聚的情况，蛋白纯度较高，因此可用于进行后续的体外组装实验。然而，我们进行多次实验，但均未成功表达出 KAK-428 的 GPC trimer-SpyTag 蛋白，原因可能在于两种毒株 GPC trimer 基因序列的差异影响了其 mRNA 的稳定性、翻译效率或者蛋白的正确折叠和稳定性，或是对 293F 细胞的转染效率有不同的响应。



图3 GPC trimer-SpyTag 的纯化

A) GA391 GPC trimer-SpyTag 的浓度测定结果图；B) GA391 GPC trimer-SpyTag 的还原性 SDS-PAGE 结果图，箭头所指为 GA391 GPC trimer-SpyTag 条带。

2.4 Scaffold-SpyCatcher 的表达与纯化

利用 IPTG 诱导感受态细胞表达转入胞内的带有 Scaffold-SpyCatcher 序列的质粒，以生产大量 Scaffold-SpyCatcher 蛋白。利用该蛋白上携带的 His tag，通过 Ni-NTA 亲和层析对其进行纯化，以 1 mL 为单位收集洗脱液。4 种原核蛋白的纯化结果如图 4 所示。

如图 4A，纯化 mi3-SpyCatcher 时前两管洗脱液浓度最高，取全菌(T)、上清(S)、沉淀(P)、流穿(F)以及这两管洗脱液进行还原性 SDS-PAGE 检测，结果如图 4B 所示。全菌与沉淀条带明显，说明 mi3 可正确大量表达，但多以包涵体形式存在，而上清及洗脱液中蛋白极少。因此，无法使用该方法纯化 mi3 蛋白。同理，如图 4C 和 4D，Ferritin 也多以包涵体形式存在，无法使用该方法进行纯化富集。而对于 I53-50A 来说，取其浓度最高的四管洗脱液同全菌(T)等进行检测，结果如图 4F 所示，与 mi3/Ferritin 不同，除全菌和沉淀外，上清和部分洗脱液中也有可观量的目的蛋白，因此后续可通过超滤管浓缩蛋白以得到较为纯净的高浓度蛋白液。同理，如图 4G 和 4H，上清中含可观量的 I53-50B，可通过浓缩得到高浓度蛋白液。

利用 10k 超滤管对 I53-50A 和 I53-50B 蛋白进行浓缩，测定其浓缩后蛋白浓度并检验其纯度，结果如图 5 所示。I53-50A-SpyCatcher 和 I53-50B 的表达量高（50 mL 菌液，蛋白得率：2-3 mg/mL，约 3 mL）。蛋白较为纯净，少量杂蛋白的存在不影响后续体外组装实验。

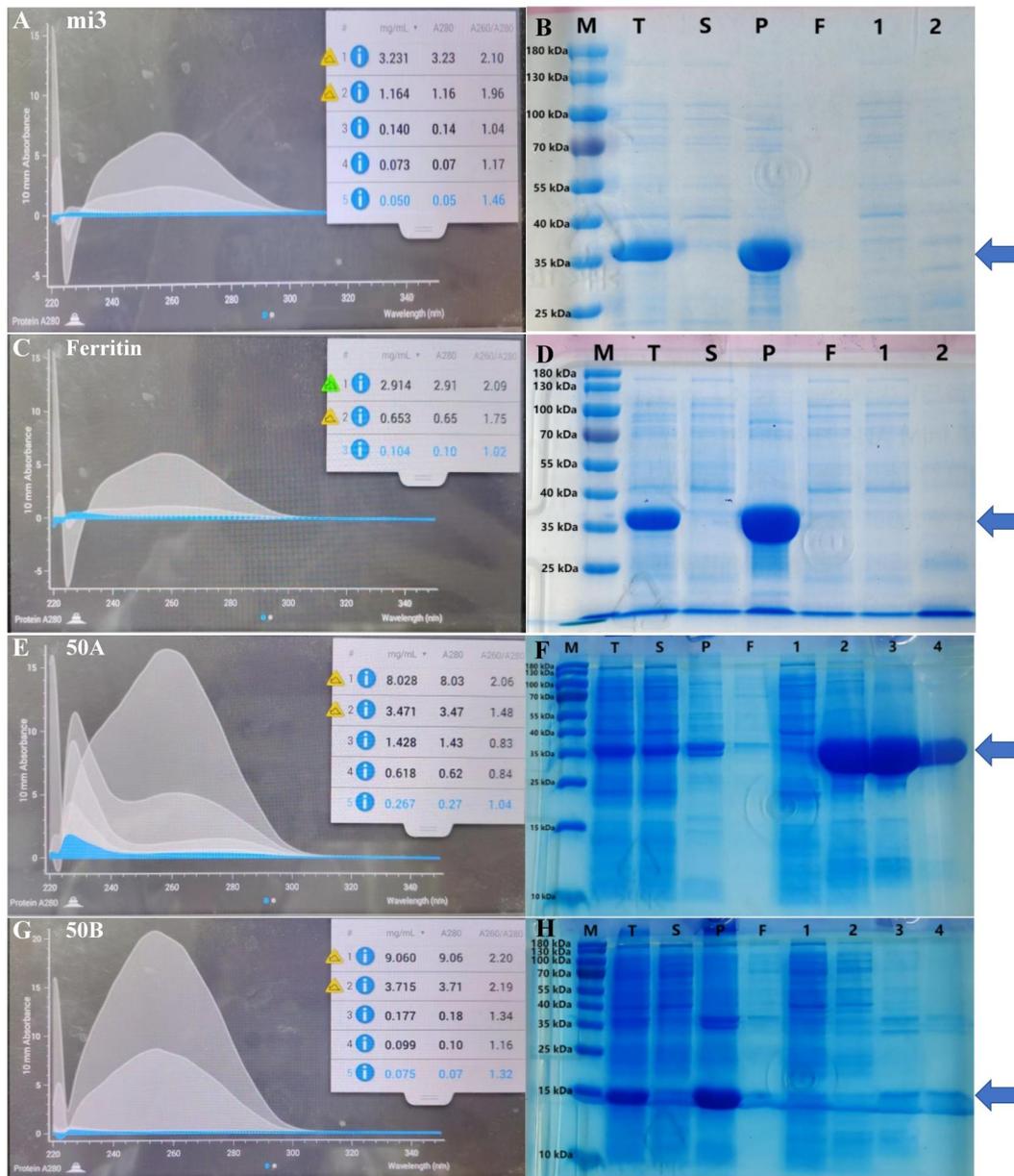


图4 Scaffold-SpyCatcher 的表达与纯化情况

A), C), E), G)分别为 mi3、Ferritin、I53-50A 和 I53-50B 的洗脱液蛋白浓度测定结果，根据蛋白浓度决定是否进行 SDS-PAGE 检测；B), D), F), H)分别为 mi3、Ferritin、I53-50A 和 I53-50B 的还原性 SDS-PAGE 结果图，T: 全菌，S: 上清，P: 沉淀，F: 流穿，洗脱液按蛋白浓度从高到低依次上样（其中，I53-50B 的 3 和 4 泳道对应 4G 的前两组蛋白，1 和 2 泳道为另一次重复的纯化实验浓度最高的两管洗脱液，未在此处展示其浓度测定结果）。



图 5 I53-50A/B 的浓缩

A), B)分别为浓缩后 I53-50A-SpyTag 和 I53-50B 的浓度测定结果；C), D)分别为 I53-50A-SpyTag 和 I53-50B 的还原性 SDS-PAGE 结果图。

2.5 纳米颗粒的体外自组装与纯化

将纯化所得的 GPC trimer-SpyTag、I53-50A-SpyCatcher 和 I53-50B 按 1:1:1 的摩尔比加入 $1\times$ PBS 中， 4°C 过夜孵育。对组装完成的蛋白液进行 SEC 纯化，峰图如图 6 所示。结果表明，在洗脱体积为 9.47 mL 处出现单一主峰，面积占比(Area%)为 82.24%。该峰对应的洗脱体积与先前研究得到的结果^[14]相近，因而认为该峰对应的蛋白为 GPC trimer NP。收集相应洗脱液并使用 50k 超滤管进行浓缩。

为了进一步确认收集液中蛋白成分，对浓缩后液体进行还原性与非还原性 SDS-PAGE 检测，检测结果如图 7 所示。结果显示，在还原性 SDS-PAGE 条件下，在 100-130 kDa 之间存在一条较浅的条带，由大小估计应为 GPC trimer-I53-50A，二者由 SpyTag/SpyCatcher 共价连接，在还原剂作用下不会分开。在非还原性 SDS-PAGE 条件下，在 >180 kDa 处存在一条明显条带，由大小估计为 GPC trimer NP。此泳道中无其他明显条带，说明组装效果较好，GPC trimer NP 较为纯净，可用于后续的 ELISA 实验。

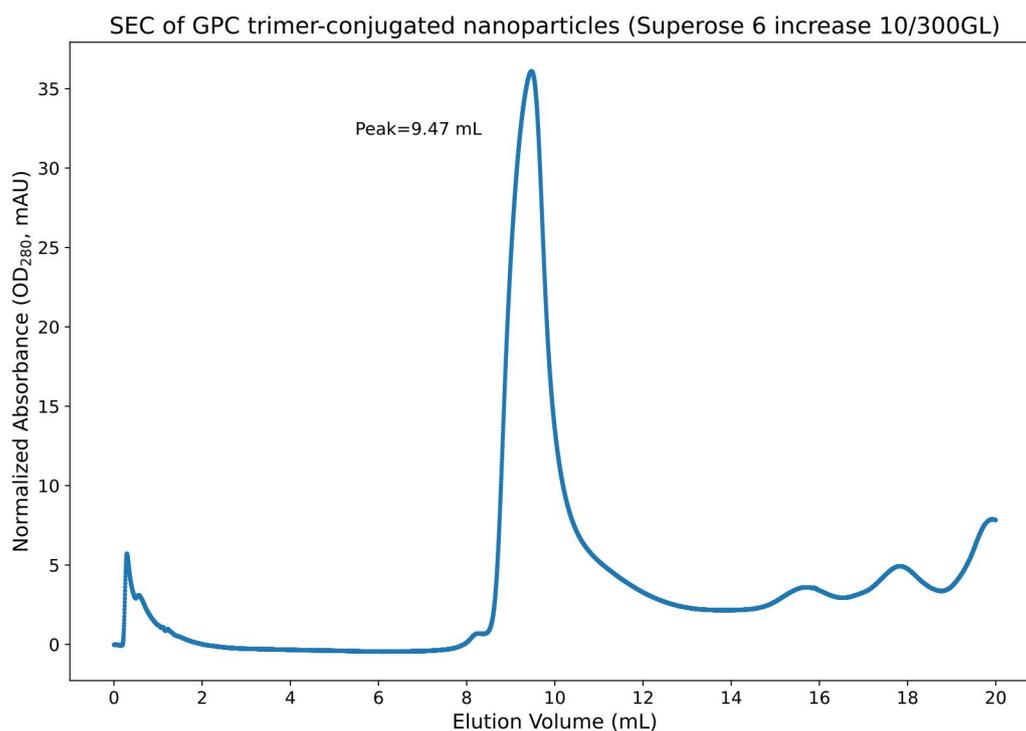


图 6 GPC trimer NP 的 SEC 纯化结果



图 7 GPC trimer NP 的组装效果检测

A) GPC trimer NP 的蛋白浓度测定结果； B) GPC trimer NP 的还原性与非还原性 SDS-PAGE 结果图。

2.6 通过 ELISA 验证 GPC trimer NP 的体外抗原性

利用 ELISA 实验，我们检测并比较了 GPC trimer 单体和 GPC trimer NP 对特异性抗体 37.7H 的亲合力，实验结果如表 1 和图 7 所示。结果显示，与 GPC trimer 单体类似，GPC trimer NP 能与 37.7H 结合（考虑抗体浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组别），表明 GPC trimer 单体的构象能够保留在纳米颗粒上。此外，在抗体浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的组别中，37.7H 对 GPC trimer NP 的结合亲和力显著高于 GPC trimer 单体。

当然，本次实验所选取的抗体浓度条件欠妥，许多组别中抗体浓度过低，导致抗原-抗体复合物含量与背景值差异较小。后续实验将增加抗体浓度范围和实验组数，绘制更为完整的浓度-反应曲线。

表 1 GPC trimer monomer/NP 与 37.7 H 抗体结合能力的 ELISA 检测结果

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	GPC trimer monomer		GPC trimer NP	
	1	2	1	2
	OD ₄₅₀			
40	0.171	0.252	0.755	0.583
8	0.063	0.061	0.092	0.121
1.6	0.056	0.052	0.067	0.075
0.32	0.058	0.055	0.065	0.091
0.064	0.062	0.056	0.067	0.104
0.0128	0.059	0.053	0.061	0.064
0.00256	0.058	0.064	0.064	0.077
0	0.065	0.067	0.09	0.083

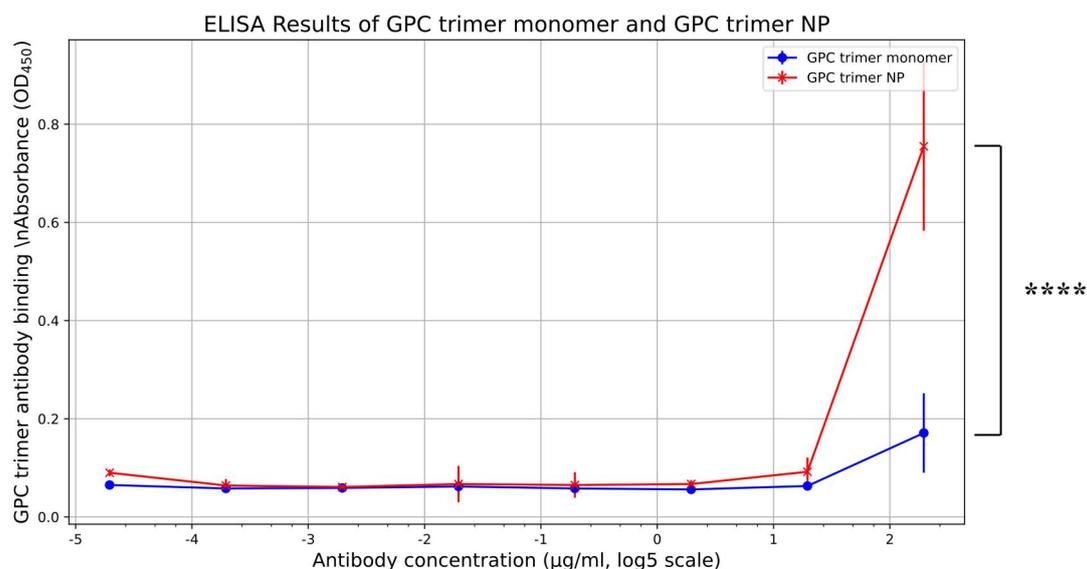


图 8 GPC trimer monomer/NP 与 37.7 H 抗体结合能力的 ELISA 检测结果

(使用双因素方差分析 ANOVA, 并采用 Dunnett's test 进行校正)

3. 讨论与展望

本课题通过分别将 Scaffold-SpyCatcher 表达载体和优化后的 GPC trimer-SpyTag 表达载体导入原核和真核表达系统, 试图表达出相应的重组蛋白。在基因表达载体构建方面, pCAGGS-GPC trimer-SpyTag 的构建是符合预期的; 在蛋白表达和纯化方面, 原核系统可溶性表达 I53-50A-SpyCatcher 和 I53-50B 蛋白的结果符合预期, 纯化实验成功, 而 mi3 和 Ferritin 蛋白则多以包涵体形式表达, 无法通过预设的纯化实验进行纯化。对于这一问题, 我们希望通过改变实验条件, 如选择更弱的载体启动子、给目的蛋白加上促溶标签或降低 IPTG 终浓

度及诱导表达温度等尝试解决,直接纯化包涵体的方案也可尝试。而对于真核系统表达 GPC trimer-SpyTag 蛋白实验来说,KAK-428 毒株的 GPC trimer-SpyTag 无法表达的原因尚不明确,或许需要通过优化转染条件、尝试不同表达系统、检查蛋白稳定性和降解途径等实验逐步排查并解决。

对于纳米颗粒的体外组装和纯化实验来说,本项目中提供的方法是可行的。最后的体外抗原性验证实验中,由于抗体浓度范围选择不当,使得该实验结果可信度不强。因此,后续我们将重做该实验,进一步充分证明 GPC trimer NP 的结合亲和力显著高于 GPC trimer 单体这一观点。

总结而言,本项目基本完成了开题预期,成功完成了 LASV GPC trimer NP 的构建,并初步证明了该纳米颗粒在体外抗原性上较 GPC trimer 单体更为优越,为后续疫苗制备和中和抗体分离提供初步抗原基础。

参考文献

[1] Garry RF. Lassa fever - the road ahead. *Nat Rev Microbiol.* 2023 Feb;21(2):87-96. doi: 10.1038/s41579-022-00789-8. Epub 2022 Sep 12. PMID: 36097163; PMCID: PMC9466315.

[2] Li S, Sun Z, Pryce R, Parsy ML, Fehling SK, Schlie K, Siebert CA, Garten W, Bowden TA, Strecker T, Huiskonen JT. Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike. *PLoS Pathog.* 2016 Feb 5;12(2):e1005418. doi: 10.1371/journal.ppat.1005418. PMID: 26849049; PMCID: PMC4743923.

[3] Willard KA, Alston JT, Acciani M, Brindley MA. Identification of Residues in Lassa Virus Glycoprotein Subunit 2 That Are Critical for Protein Function. *Pathogens.* 2018 Dec 26;8(1):1. doi: 10.3390/pathogens8010001. PMID: 30587764; PMCID: PMC6471855.

[4] Hastie KM, Zandonatti MA, Kleinfelter LM, Heinrich ML, Rowland MM, Chandran K, Branco LM, Robinson JE, Garry RF, Saphire EO. Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus. *Science.* 2017 Jun 2;356(6341):923-928. doi: 10.1126/science.aam7260. PMID: 28572385; PMCID: PMC6007842.

[5] Hastie KM, Cross RW, Harkins SS, Zandonatti MA, Koval AP, Heinrich ML, Rowland MM, Robinson JE, Geisbert TW, Garry RF, Branco LM, Saphire EO. Convergent Structures Illuminate Features for Germline Antibody Binding and Pan-Lassa Virus Neutralization. *Cell.* 2019 Aug 8;178(4):1004-1015.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.020. PMID: 31398326; PMCID: PMC6814208.

[6] doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.21.488985>.

[7] Diaz-Arévalo, Diana, and Mingtao Zeng. "Nanoparticle-based vaccines: opportunities and

limitations.” *Nanopharmaceuticals* (2020): 135 – 150. doi:10.1016/B978-0-12-817778-5.00007-5.

[8] 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. *Nat Commun.* 2022 May 13;13(1):2674. doi: 10.1038/s41467-022-30222-w. PMID: 35562337; PMCID: PMC9106700.

[9] Cohen AA, van Doremalen N, Greaney AJ, Andersen H, Sharma A, Starr TN, Keeffe JR, Fan C, Schulz JE, Gnanapragasam PNP, Kakutani LM, West AP Jr, Saturday G, Lee YE, Gao H, Jette CA, Lewis MG, Tan TK, Townsend AR, Bloom JD, Munster VJ, Bjorkman PJ. Mosaic RBD nanoparticles protect against challenge by diverse sarbecoviruses in animal models. *Science.* 2022 Aug 5;377(6606):eabq0839. doi: 10.1126/science.abq0839. Epub 2022 Aug 5. PMID: 35857620; PMCID: PMC9273039

[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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 20;109(12):E690-7. doi: 10.1073/pnas.1115485109. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22366317; PMCID: PMC3311370.

[11] Liu Z, Zhou H, Wang W, Tan W, Fu YX, Zhu M. A novel method for synthetic vaccine construction based on protein assembly. *Sci Rep.* 2014 Dec 1;4:7266. doi: 10.1038/srep07266. PMID: 25434527; PMCID: PMC4248271.

[12] Kang YF, Sun C, Zhuang Z, Yuan RY, Zheng Q, 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 C, Zhao JC, Zeng MS. Rapid Development of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Candidates. *ACS Nano.* 2021 Feb 23;15(2):2738-2752. doi: 10.1021/acsnano.0c08379. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33464829.

[13] Gunn BM. Holding it together: Nanoparticle stabilization of LASV trimer. *Cell Host Microbe.* 2022 Dec 14;30(12):1660-1661. doi: 10.1016/j.chom.2022.11.009. PMID: 36521442.

[14] Brouwer PJM, Antanasijevic A, Ronk AJ, et al. Lassa virus glycoprotein nanoparticles elicit neutralizing antibody responses and protection. *Cell Host Microbe.* 2022;30(12):1759-1772.e12. doi:10.1016/j.chom.2022.10.018

致谢

非常感谢王鹏飞老师对我实验室实习的指导和对我课题进程的关心和帮助！此外，我还要感谢手把手指导我做实验的各位师兄师姐，感谢他们愿意在我实验失败时和我一起分析原因，鼓励我继续向前！

指导教师评语

赵星义同学自进入我实验室以来，积极进取，执行能力强，表现出较强的科学研究素养。他能合理安排自己的上课和科研时间，按时完成该课题，并成功取得了符合预期的实验结果。在实验室开展实验的过程中，他总能快速学会需要进行的实验操作，明白各步骤背后的原理和意义，同时也能提出一些关键性的问题并虚心地向实验室的师兄师姐请教。

本课题《LASV 糖蛋白复合物纳米颗粒的构建及功能性验证》利用多种实验方法，创新性地将 SpyTag/SpyCatcher 技术运用到 LASV 疫苗的开发中去，为 LASV 疫苗的空白提供了初步的抗原基础，研究内容严谨且全面。

指导教师: 

2024年 11月 9日