

DOI:10.13350/j.cjpb.230901

• 论著 •

基于鱼精蛋白递送 SARS-CoV-2 DNA 疫苗的制备及体外表达与体内免疫分析*

刘瑛琪^{1,2}, 李静如¹, 孟繁¹, 邢昊楠¹, 郑爱萍^{1**}

(1. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 华北理工大学药学院)

【摘要】 目的 利用非病毒基因载体的鱼精蛋白递送 SARS-CoV-2 DNA, 筛选最佳比例的 PS-RBD 纳米粒, 并对其体外摄取能力与体内免疫水平评价。方法 选择优化的 RBD 基因序列构建重组 RBD 质粒, 不同量的鱼精蛋白与 pDNA 经过室温孵育可得不同 N/P 比 PS-RBD 纳米粒。马尔文粒径仪测定粒径、PDI 及 Zeta 电位, 透射电镜观察形态。核酸凝胶电泳和结合沉淀试验检测鱼精蛋白保护 pDNA 抗刷烈外力和核酸酶的降解情况, CCK8 法检测其细胞毒性, 激光共聚焦显微镜和流式细胞检测比较其与裸 DNA 对 DC2.4 细胞转染率。用 PS-RBD 疫苗免疫小鼠, 检测小鼠血清中 IgG 抗体和 IFN- γ 水平。结果 5/1 的 PS-RBD 纳米粒形态规整, 平均粒径为 (235.0 \pm 4.7) nm, 其保护 pDNA 抵抗刷烈外力和核酸酶的降解效果最佳, 稳定性良好, 细胞毒性低, 安全性高。体外转染试验显示 SARS-CoV-2 RBD 基因可进入细胞并表达, 体内免疫试验表明该疫苗可诱导小鼠产生体液免疫及细胞免疫应答。结论 鱼精蛋白作为非病毒基因载体制备工艺简单、性能良好, 用 PS-RBD 疫苗免疫小鼠可诱导产生体液免疫及细胞免疫应答, 可为 SARS-CoV-2 疫苗研发提供新思路。

【关键词】 鱼精蛋白; SARS-CoV-2; DNA 疫苗; 体内免疫

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-0993-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):993-999.]

Preparation of SARS-CoV-2 DNA vaccine based on protamine delivery, *in vitro* expression and *in vivo* immunoassay

LIU Yingqi^{1,2}, LI Jingru¹, MENG Fan¹, XING Haonan¹, ZHENG Aiping¹ (1. Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. North China University of Science and Technology)***

【Abstract】 **Objective** This study aimed to deliver SARS-CoV-2 DNA using a non-viral gene carrier, protamines, to identify the optimal proportion of PS-RBD nanoparticles, and evaluate their *in vitro* uptake capability as well as *in vivo* immunogenicity. **Methods** An optimized RBD gene sequence was selected to construct the recombinant RBD plasmid. Different quantities of protamines and pDNA were incubated at room temperature to obtain PS-RBD nanoparticles at varying N/P ratios. The Malvern particle size analyzer was used to measure the size, PDI, and Zeta potential of the nanoparticles, while their morphology was observed using a transmission electron microscope. Gel electrophoresis and binding precipitation tests were employed to examine the protection offered by protamines to pDNA against external forces and nucleic acid enzyme degradation. The CCK8 assay was used to assess cytotoxicity, and laser confocal microscopy and flow cytometry were used to compare the transfection rates of the nanoparticles and naked DNA into DC2.4 cells. Mice were immunized with the PS-RBD vaccine, and their serum IgG antibody and IFN- γ levels were measured. **Results** PS-RBD nanoparticles at a 5/1 ratio exhibited uniform morphology with an average particle size of (235.0 \pm 4.7) nm. These nanoparticles displayed the best protective effects against external forces and nucleic acid enzyme degradation, demonstrating good stability, low cytotoxicity, and high safety. *In vitro* transfection experiments revealed that the SARS-CoV-2 RBD gene could enter cells and express with a positive transfection rate of up to 34.5%. *In vivo* immunological tests showed that after three immunizations with the PS-RBD vaccine, the IgG antibody titer reached 10³, with significant differences in IgG and IFN- γ levels compared to the naked DNA group. The vaccine was found to induce both humoral and cellular immune responses in mice. **Conclusion** protamines, as non-viral gene carrier, offers a simple preparation process and excellent performance. Immunizing mice with the PS-RBD vaccine can induce humoral and cellular immune responses, provi-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82104105)。

** **【通讯作者】** 郑爱萍, E-mail: apzheng@163.com; 邢昊楠, E-mail: 609206498@qq.com

【作者简介】 刘瑛琪(1997-), 女, 辽宁葫芦岛人, 在读硕士研究生。研究方向: 基因递送。E-mail: 1549216916@qq.com

ding a novel approach to SARS-CoV-2 vaccine research and development.

【Key words】 Protamine; SARS-CoV-2; DNA vaccines; immunity *in vivo*

新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 简称新冠肺炎, 由 SARS-CoV-2 感染引起, 是近年来人类面临的影响最大范围最广的全球性疾病。新冠肺炎流行是重大的公共卫生事件, 接种疫苗是控制疫情和预防死亡的最佳策略^[1-3]。目前针对 SARS-CoV-2 的疫苗, 包括灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗、病毒载体疫苗、核酸疫苗 (mRNA、DNA 疫苗) 等, 其中 DNA 疫苗具有研发速度快、生产制备简单、稳定性高等特点, 可同时诱导体液免疫和细胞免疫, 持续表达靶抗原, 不良反应少, 安全性高, 有望在新冠领域发挥重要作用^[4-5]。SARS-CoV-2 主要通过刺突蛋白 (S 蛋白) 与宿主细胞受体结合, 从而介导病毒的入侵。S 蛋白是一类大分子三聚体跨膜糖蛋白, 可识别宿主细胞受体并介导膜融合, 是病毒感染宿主细胞的关键因子。而 S 蛋白结构域的细胞受体结合区 (Receptor binding domain, RBD) 直接与细胞表面的血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 受体结合而进入人体^[6], 是中和抗体的主要靶点, 因此 SARS-CoV-2 的 DNA 疫苗选取 RBD 作为靶抗原序列。为避免 DNA 被体内核酸酶清除, 导致较低的免疫原性, 故选择天然高分子非病毒基因载体的鱼精蛋白 (Protamines, PS) 作为质粒 DNA (plasmid DNA, pDNA) 载体。鱼精蛋白是一类由组蛋白进化而来的富含精氨酸的小核蛋白, 相较常规组蛋白, 鱼精蛋白带有更强的正电荷, 因此其与 DNA 具有更强的结合力^[7]。鱼精蛋白作为聚阳离子对 DNA 进行缩合, 不仅使 DNA 伸展的长链得以压缩, 提高其抵抗剧烈外力的能力^[8], 而且能增强基因的体内外转染效率^[9]。鱼精蛋白的临床安全性已经得到确认, 不仅抗原性弱, 而且具有优良的生物相容性^[10]。鱼精蛋白含有核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS), 可被运送到细胞核中, 有助于提高外源性物质进入细胞核的效率^[11]。

本研究将鱼精蛋白与 RBD DNA 通过简单孵育制成 PS-RBD 纳米粒^[12], 依据大小、电位及鱼精蛋白保护 pDNA 能力筛选出最佳比例的 PS-RBD 纳米粒, 并对其形态表征、稳定性、体外表达及体内免疫水平评价, 为 SARS-CoV-2 DNA 疫苗的研发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 15 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 购于北京维通利华实验动物

技术有限公司, 饲养于军事医学科学院毒物药物研究所动物实验室。饲养期间各组小鼠自由饮水, 饲喂 SPF 级饲料 (由北京维通利华公司提供)。饲养环境: 温度 22~25 °C, 湿度 50%~70%。所有操作均符合实验动物伦理学要求。

1.2 主要试剂 LB 液体培养基和氨苄青霉素购于北京酷来博科技有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购于天根生化科技有限公司; 鱼精蛋白, 4% 多聚甲醛, Dil 和 DAPI 购于北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; Cell staining buffer 购于安诺伦生物科技有限公司; Opti-MEM 培养基和胎牛血清购于美国 Thermo 公司; DC2.4 细胞及青、链霉素购于武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM 培养基购于维森特生物技术有限公司; DNA marker 购于天根生化科技有限公司; SARS-CoV-2 RBD antibody 购于北京义翘神州生物技术有限公司; 琼脂糖购于深圳市达科为生物工程有限公司; Loading buffer, Yea Red 核酸染料购于北京翌圣生物科技有限公司; IFN- γ 检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; Alexa Fluor 647 偶联试剂盒-Lightning-Link 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 购于英国 Abcam 公司; 重组质粒由北京擎科生物有限公司合成。

1.3 主要仪器 立式压力蒸汽灭菌器 (LS-B50L), 购于江阴滨江医疗设备有限公司; 冷冻离心机 (5804R), 德国 Eppendorf 公司生产; NanoDrop Lite 分光光度计 (MD-L27E), 多功能酶标仪 (Varioskan Lux) 及细胞培养箱 (Forma series II) 为美国 Thermo 公司生产; 马尔文粒径仪 (Nano-ZS90), 英国 Malvern 公司生产; 透射电镜 (H-7650), 日本 HITACHI 公司生产; 凝胶成像仪 (5200Multi) 购于上海天能生命科学有限公司; 光学显微镜 (CKX41), 日本 OLYMPUS 公司生产; 激光共聚焦显微镜 (LSM880), 德国 Carl Zeiss 公司生产; 流式细胞仪 (BD FACS Ariana™ II), 美国 BD 公司。

2 方法

2.1 重组质粒的构建与鉴定 SARS-CoV-2 的 DNA 疫苗选取 RBD 作为靶抗原序列, 使用 SAC I 和 XBA I 作为酶切位点将其插入至 pcDNA3.1 (+) 载体中 (图 1)。同时在 RBD 基因序列后添加一段绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因序列, 构建 RBD-GFP 质粒, 由北京擎科生物有限公司合成。

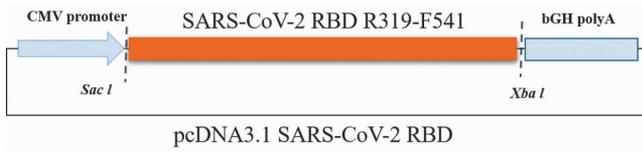


图1 RBD质粒的构建示意图
Fig. 1 Schematic diagram of RBD plasmid construction

取1 μL 合成质粒加入到大肠埃希菌感受态细胞中,混合后置于冰上冰浴30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中热激65 s,再置于冰上冰浴5 min,然后均匀涂于氨苄抗性的LB固体培养皿中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养12 h。挑取单克隆菌落于盛有250 mL液体LB培养基的锥形瓶中,同时加入250 μL 氨苄青霉素,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min振荡培养14 h,待菌液达到合适的浑浊度后用无内毒素提取试剂盒提取质粒进行0.6%琼脂糖凝胶电泳分析并测序,使用Nano drop lite分光光度计测定浓度及纯度。

2.2 PS-RBD复合物的制备 鱼精蛋白是一类富含精氨酸残基的阳离子多肽,能与DNA的磷酸-戊糖骨架结合,形成“环状”的PS-DNA复合物(图2)。鱼精蛋白与 ρ_{pDNA} 以电荷比(N/P)的形式来表示,其换算公式为:
$$N/P = [(\rho_{\text{protamine}} \times 21) / (4250 \times 5)] / (\rho_{\text{pDNA}} / 308)$$
。其中, $\rho_{\text{protamine}}$ 和 ρ_{pDNA} 分别表示鱼精蛋白和pDNA的质量浓度;21为鱼精蛋白中的精氨酸残基数;5为体积的换算系数;4250和308分别为鱼精蛋白和DNA中一个核苷酸的分子质量。鱼精蛋白硫酸盐用去离子水溶解,配成浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的PS溶液。DNA浓度恒定为396 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。PS:DNA按N/P(聚合物载体中的 NH_3^+ 与DNA中的 PO_3^- 的电荷的摩尔比^[12])分别为0.5/1、1/1、1.5/1、2/1、3/1、5/1的比例混合,涡旋使其充分混合,室温静置30 min,即获得不同N/P比的PS-RBD溶液。

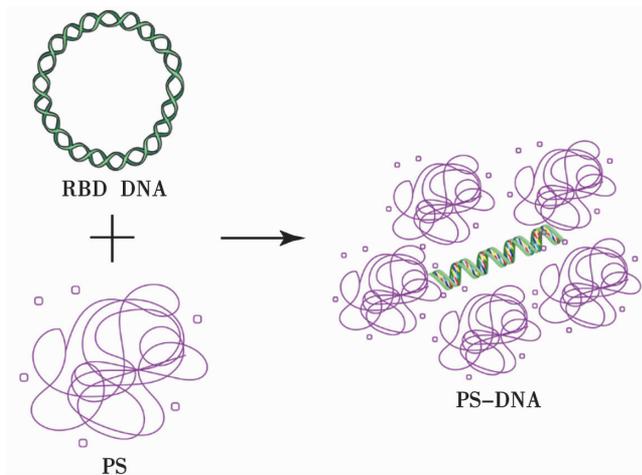


图2 PS-DNA复合物合成原理图
Fig. 2 Schematic diagram of PS-DNA complex synthesis

2.3 PS-RBD复合物结构表征观察 不同N/P比例的PS-RBD溶液各取10 μL ,分别滴在100目铜网格上30 min,再用蒸馏水冲洗两次,吸掉水分后通过透射电镜观察复合物的状态。

2.4 PS-RBD复合物的核酸凝胶电泳分析 取不同N/P比PS-DNA溶液采用0.6%(300 $\text{mg}/50 \text{ mL}$)琼脂糖凝胶以电压120 V电泳40 min,置于凝胶成像仪上进行拍照。

2.5 PS-RBD复合物结合沉淀试验 分别取1.5 mL不同N/P比的PS-RBD溶液,1200 r/min(离心半径9.5 cm)离心15 min,取10 μL 上清液,用Nano drop lite分光光度计测定 A_{260} 值和 A_{280} 值。

2.6 PS-RBD复合物稳定性测定 将不同N/P比的PS-RBD溶液于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置7 d,然后各取1 mL,采用马尔文粒径仪测定粒径及电位,评估其稳定性。

2.7 CCK8法测定细胞毒性 在96孔板中加入180 μL 的DC2.4细胞悬液,密度为 1×10^3 个细胞/孔,于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱预培养24 h;分别于96孔板的1、2、3、4、5排各孔分别加入1、2、4、6、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的PS-RBD复合物溶液,同上孵育24 h;每孔加入10 μL CCK8试剂,同上孵育1 h,用酶标仪测定在 A_{450} 值。

2.8 细胞转染 将DC2.4树突细胞接种到6孔板中,密度为 1×10^6 个细胞/孔,培养24 h至细胞汇合度 $\geq 70\%$ 。将鱼精蛋白与RBD质粒用不含血清的DMEM培养基配成一定浓度的溶液,然后将鱼精蛋白与RBD质粒以一定的N/P比混合,室温放置30 min。吸去培养板孔中的培养液,加入不同比例转染复合物后继续培养6 h,以加入DMEM培养基作为对照组。吸去转染复合物,每孔加入新鲜的含10%小牛血清(FBS)的DMEM培养基,于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养48 h,荧光显微镜下观察荧光的表达。另用PBS冲洗转染细胞,再用0.25%胰酶/EDTA消化液消化,细胞用PBS重悬后用流式细胞仪检测每 10^6 个细胞中表达荧光的细胞百分数,评价转染效率。

2.9 小鼠免疫及血清IgG抗体和IFN- γ 检测 15只6~8周龄的雌性BALB/c小鼠适应性喂养7 d,并分为PBS肌肉注射组,裸DNA肌肉注射组,PS-DNA肌肉注射组,每组5只。分别于第0、2、4周,PS-DNA组肌注按N/P比5:1比例混合的PS-DNA,每只156 μL (50 μg);裸DNA组肌注同剂量RBD,PBS组肌注同体积的PBS。分别于第1、3、5周取小鼠眼眶血,分离血清,采用ELISA检测特异IgG抗体水平。RBD包被浓度为1 $\text{ng}/\mu\text{L}$,血清用5%山羊血清作1:300、1:900、1:2700、1:8100、1:24300、1:72900稀释,HRP-IgG用2%山羊血清作1:2000稀释。加入显色液显色20 min后终止反应,用酶标仪测各孔 A_{450}

值。结果判定:其中数值高于对照组的 2.1 倍为阳性,其最大稀释倍数为该样品血清的特异性抗体的滴度值。IFN- γ ELISA 检测按试剂盒说明书操作。小鼠 PS-DNA 免疫及抗体和细胞因子检测流程图见图 3。

2.10 统计学分析 使用 GraphPad Prism 软件进行数据分析并制图,每组试验至少重复 3 次,获得 3 组独立试验结果。两组间比较采用非配资料的对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

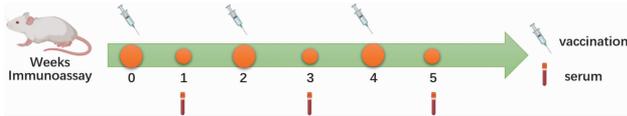
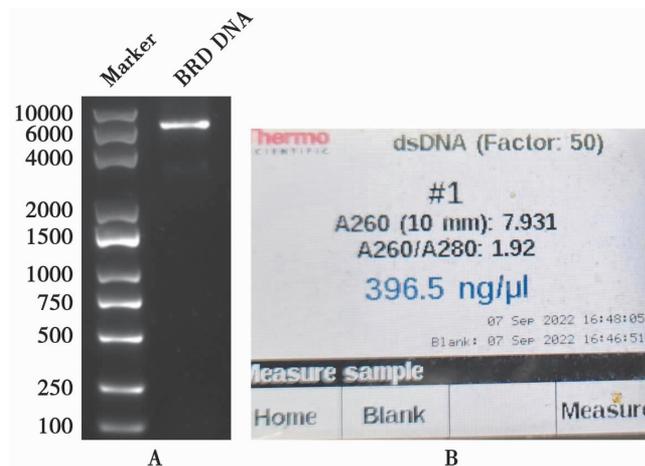


图 3 PS-DNA 小鼠给药时间及其免疫检测流程图 ($n=5$)
Fig. 3 Timing of administration of PS-DNA mice and flow chart of their immunoassay

结果

1 重组质粒的构建与鉴定

选取 RBD 作为靶抗原序列,使用 SAC I 和 XBA I 作为酶切位点将其插入至 pcDNA3.1(+)载体中,同时在 RBD 基因序列后添加一段绿色荧光蛋白基因序列,构建 RBD-GFP 质粒。经 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的基因片段为 669 bp (图 4A),与理论值相符。重组质粒经限制性酶切后获得大小为 6 114 bp 的插入目的基因片段 (图 4B),与预期相符。使用 Nano Drop Lite 分光光度计测定质粒浓度 ≥ 500 ng/ μ L; A_{260}/A_{280} 为 1.92,纯度符合要求。全质粒测序显示重组质粒 RBD 构建正确。



A 质粒完整性的检测 B 质粒的浓度及纯度
图 4 重组 RBD 质粒的评价

A Detection of plasmid integrity B Concentration and purity of plasmid.

Fig. 4 Evaluation results of recombinant RBD plasmids

2 PS-RBD 复合物的粒径与电位

利用纳米粒径仪测试制备的不同 N/P 比 PS-RBD 复合物的粒径,结果如表 1,随着反应体系中鱼精

蛋白量的增加,形成的复合体的粒径也降低。

表 1 PS-RBD 复合物粒径大小 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Particle sizes of the PS-RBD complexes

N/P	D(90)/nm
0.5/1	1662.6 \pm 37.2
1/1	449.3 \pm 9.8
1.5/1	461.4 \pm 6.3
2/1	360.7 \pm 7.3
3/1	278.3 \pm 3.8
5/1	235.0 \pm 4.7

3 PS-RBD 复合物的稳定性

PS-RBD 于 -4 $^{\circ}$ C 放置 7 d 后,肉眼观察溶液中无聚集和浑浊现象。粒径和电位变化如图 5 所示,5/1 的 PS-RBD 平均粒径从 (235.0 \pm 4.7 nm) 变为 (236.8 \pm 5.3) nm, Zeta 电位从 (16.33 \pm 0.44) mV 变为 (17.21 \pm 0.47) mV。可见纳米粒的粒径和电位变化幅度均较小,具有良好的稳定性。

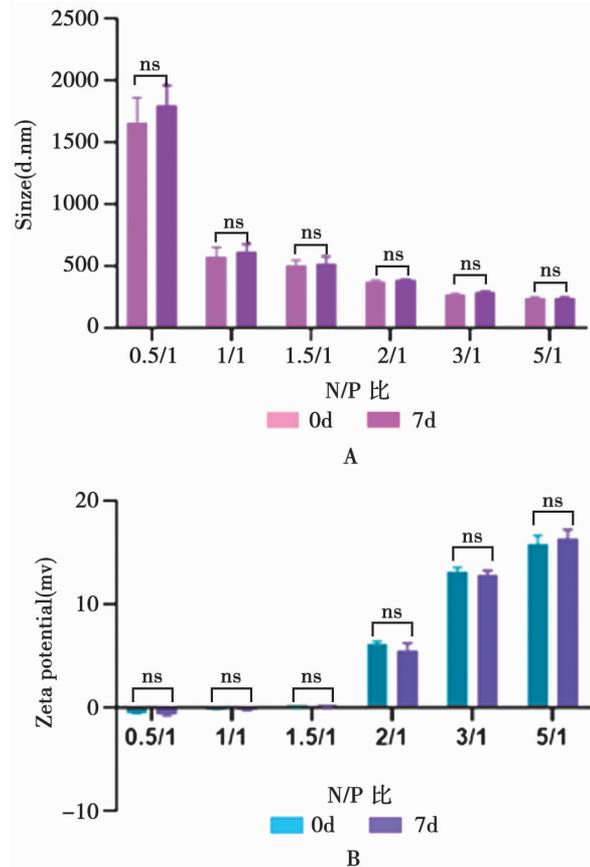
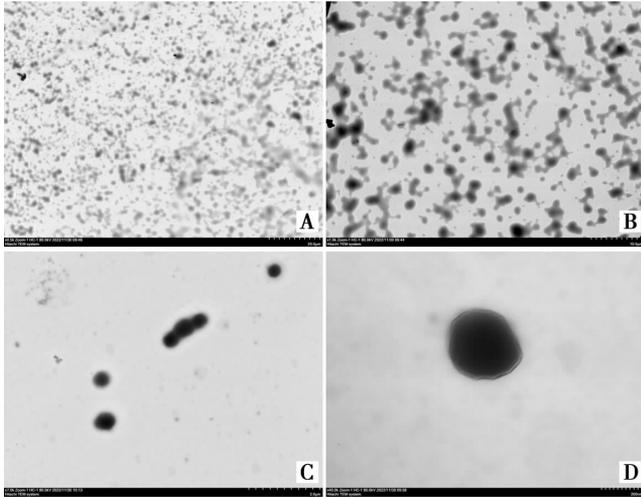


图 5 PS-RBD 放置 7d 粒径 (A) 及电位 (B) 变化
Fig. 5 Changes in particle size (A) and potential (B) of PS-RBD after 7 days of placement

4 PS-RBD 形态表征

透射电镜观察制备的 PS-RBD 复合体的表面形态,结果如图 6。随着反应体系中鱼精蛋白量的增加,形成的复合体粒径也降低。其中,N/P 比为 2/1,3/1 比例的 PS-DNA 背景杂乱,粒径不均一;5/1 比例的

PS-DNA 粒径较小且均一,呈圆形。



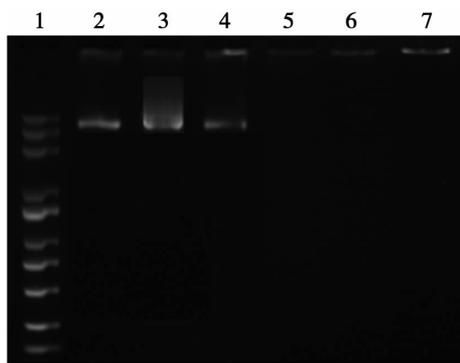
A N/P 比为 2/1 B N/P 比为 3/1 C、D N/P 比为 5/1

图 6 TEM 下的不同 N/P 比的 PS-RBD 复合物形态
A 2/1 B 3/1 C、D 5/1.

Fig. 6 TEM plot of the N/P ratio(A) PS-RBD complex

5 凝胶阻滞试验结果

不同 N/P 比的 PS-RBD 复合物凝胶阻滞电泳结果如图 7。当复合物的 N/P 小于 2/1 时,可出现条带,表明 DNA 未被缩合,溶液中有一定游离的 DNA。随着 N/P 比的增加,PS-RBD 的游离 DNA 的量显著降低。当 N/P \geq 2 时无滞留条带,DNA 的迁移基本被阻滞,证明鱼精蛋白成功包裹 RBD 质粒。未能观察到滞留亮带,是由于鱼精蛋白能阻碍溴化乙啶插入 DNA 分子使荧光强度减弱所致。



1 DNA 标志物 2~7 PS-RBD 的 N/P 比分别为 0.5/1,1/1,1.5/1,2/1,3/1,5/1

图 7 PS-RBD 复合物凝胶阻滞电泳图

1 DNA maker 2-7 The N/P ratio of PS-RBD is 0.5/1,1/1,1.5/1,2/1,3/1,5/1, respectively

Fig. 7 PS-RBD complex agarose gel electrophoresis

6 结合沉淀试验结果

在 DNA 浓度为 396 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 情况下,通过测定上清液 DNA 浓度比较不同 N/P 比鱼精蛋白包载 DNA 情况。由图 8 曲线下下降趋势可以看出,N/P 比越高,两者上清液中的 DNA 浓度越低,说明鱼精蛋白包裹

DNA 的能力随 N/P 比的增大而增强。当 PS-RBD 的 N/P 比达到 5/1 时,游离 DNA 含量接近于 0,表明 PS-RBD 的最佳 N/P 比为 5/1。

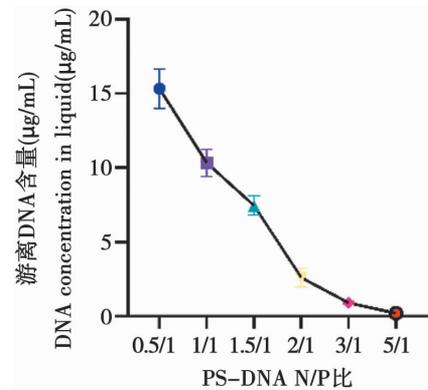
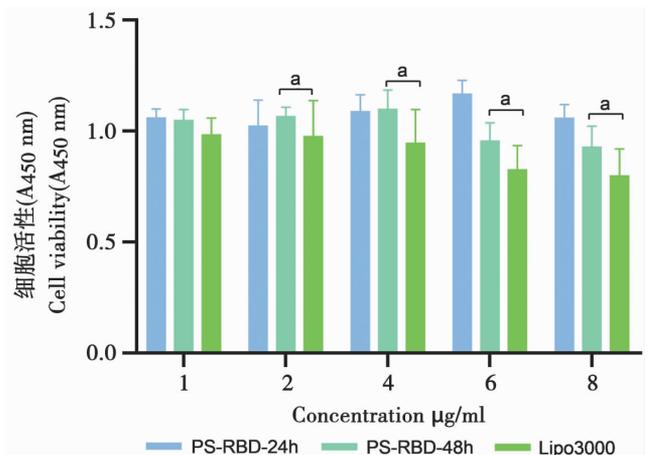


图 8 PS-RBD 复合物中游离 DNA 含量变化

Fig. 8 Proportion of free DNA binding curves in protamine-RBD complexes

7 细胞毒性

采用 CCK-8 法测定不同浓度的 PS-RBD 对 DC2.4 细胞作用 24、48 h 的细胞毒性,并以 Lipo3000 作用 24 h 的细胞毒性作为对照。如图 9 所示,不同浓度下 PS-RBD 在细胞存活率均大于 90%。pDNA 浓度 \geq 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,PS-RBD 细胞毒性显著低于 Lipo3000,即使 PS-RBD 复合物浓度高达 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 也未显示出明显的细胞毒性,表明优化工艺制备的 PS-RBD 对 DC2.4 细胞活性无抑制作用,无毒性,构建的 SARS-CoV-2 DNA 疫苗纳米粒递送系统具有较高的安全性。



注:a 组间比较, $P < 0.05$ 。

图 9 不同浓度 PS-RBD 纳米粒的细胞毒性比较

Fig. 9 Cytotoxicity comparison of PS-RBD complexes at different concentrations

8 体外转染试验结果

载体转染效率通过转染 DC2.4 细胞 40~48 h 倒置于荧光相差显微镜下观察 PS-RBD-GFP、裸 RBD-GFP 的转染情况。由图 10 可以看出,裸 RBD-GFP 质

粒组未检测到绿色荧光,而 PS-RBD-GFP 组可检测到明显绿色荧光。通过流式细胞术测定每 10^5 个细胞中发荧光的细胞百分数获得转染率,结果如图 11。PS-RBD 组阳性率为 30.45%,裸 RBD 组阳性率为 4.56%,表明 PS-RBD 可使 SARS-CoV-2 RBD 基因进入细胞并表达目的蛋白。

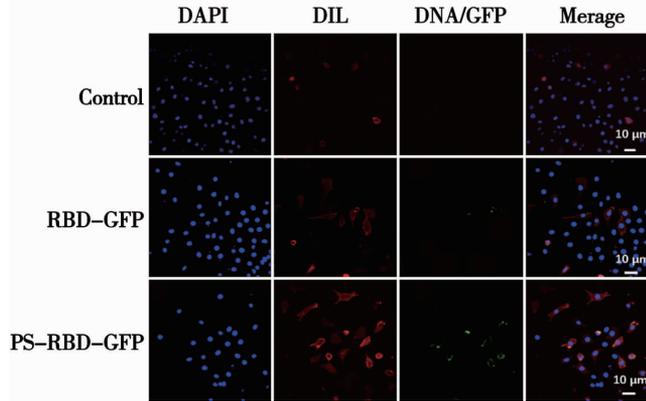


图 10 PS-RBD 转染 DC2.4 细胞荧光检测
Fig. 10 PS-RBD transfection of cells *in vitro* results

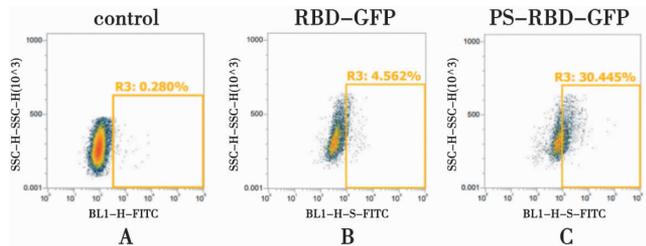


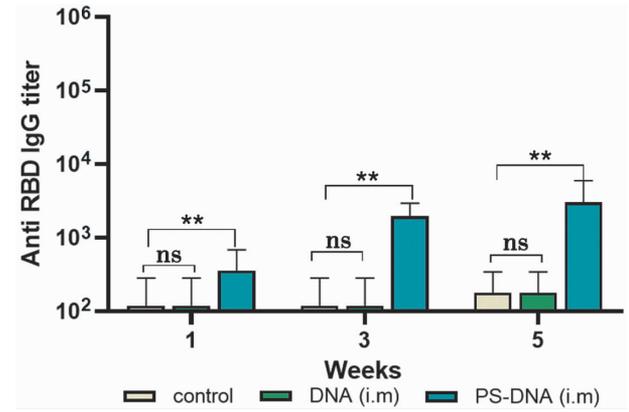
图 11 PS-RBD 转染 DC2.4 细胞流式检测
Fig. 11 PS-RBD protein expression levels in mouse dendritic cells

9 免疫小鼠血清特异 IgG 及 IFN- γ 水平

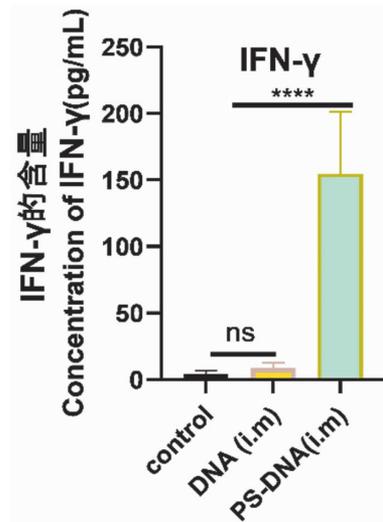
采用 ELISA 检测 PS-DNA、裸 DNA 和 PBS 免疫小鼠血清中特异 IgG 与 IFN- γ 水平,结果如图 12A 和图 12B。PS-DNA 免疫组小鼠血清特异 IgG 和 IFN- γ 水平显著升高,与裸 DNA 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中血清特异 IgG 在第 3 次免疫后 1 周到达高峰,滴度为 10^3 。裸 DNA 组小鼠血清特异 IgG 水平较低。PS-DNA 免疫组小鼠血清 IFN- γ 同样在 3 免后达到峰值水平。表明 PS-DNA 不仅可诱导体液免疫反应,同时可引起细胞免疫反应。

讨论

COVID-19 疫情给全球带来不同程度的影响,对经济增长、社会公共健康造成了巨大冲击。随着各种更强传播性变异株的出现,继续开发新的疫苗平台、采用不同的疫苗开发策略以进一步提高疫苗的稳定性、有效性和安全性迫在眉睫^[13]。



注:a 组间比较, $P < 0.05$ 。
图 12 PS-RBD 免疫小鼠血清 IgG 抗体水平
Fig. 12 Detection of IgG antibody levels in serum after PS-RBD immunization in mice



注:a 组间比较, $P < 0.01$ 。
图 13 PS-RBD 免疫小鼠血清 IFN- γ 水平
Fig. 13 Detection of IFN- γ levels in serum after PS-RBD immunization in mice

本研究选择鱼精蛋白作为非病毒载体递送 SARS-CoV-2 DNA 疫苗,鱼精蛋白为阳离子聚合物,是从海洋鱼类提取得到的天然产物,已被美国批准用于临床应用,其抗原性弱且安全性好^[14]。选择 SARS-CoV-2 RBD 区域为疫苗靶点,设计合成 SARS-CoV-2 重组 RBD 质粒,并使用具有较高生物相容性及较弱的抗原性等诸多优势的鱼精蛋白递送 DNA。纳米载体的尺寸、电荷等物理化学性质可影响纳米载体的递送效率^[15],较小粒径的纳米载体易被细胞摄取^[16]。由于细胞膜带负电荷,带正电的纳米载体更易被细胞摄取^[17]。PS-RBD 的粒径随着 N/P 比的升高而降低,其表面电位随着 N/P 比的升高而升高。对 PS-RBD 纳米颗粒做阻滞试验,0.6%的核酸凝胶电泳可以看出 N/P 比在 2/1 后可阻滞 DNA 的迁移,故选用大于 2/1 比例的 PS-RBD 通过透射电镜观察形态,其中通过

TEM 观察到 5/1 的 PS-RBD 呈现圆形,且边缘清晰。结合沉淀试验结果进一步表明,N/P 比越高,载体包裹 DNA 的能力越强,其中 5/1 的 PS-RBD 溶液中游离 DNA 接近于 0。因此,PS-RBD 的最佳 N/P 比为 5/1。CCK8 法测定细胞毒性,结果显示 PS-RBD 与 Lipo3000 有显著差别,其细胞毒性较低。通过激光共聚焦显微镜观察 PS-RBD-GFP 在 DC2.4 细胞中表达的绿色荧光蛋白强于裸 RBD-GFP,流式细胞检测结果表明其体外细胞转染效率可达 30.45%,而裸 RBD-GFP 仅为 4.50%。基于鱼精蛋白带正电荷的特性,以及 Zeta 电位的检测结果,推测在 PS-RBD-GFP 与 DNA 孵育过程中通过静电力相互作用结合,中和了 DNA 所带负电,使其与同样带负电荷的细胞膜表面接触概率增加,最终呈现出 RBD-GFP 入胞增加的结果^[14]。

接种新冠疫苗后刺激产生的血清中和抗体可以对机体产生保护作用^[18],其中抗体 IgG 水平对中和效力的影响最大^[19],代表机体体液免疫水平。IFN- γ 是一种重要的效应细胞因子,刺激巨噬细胞杀死和清除细胞内的病毒^[20],代表机体细胞免疫水平。本研究用 PS-RBD 免疫小鼠,ELISA 检测血清中的特异 IgG 和 IFN- γ 水平显著升高,3 次免疫后 1 周达到高峰,表明 PS-RBD 可诱导机体产生较强的体液免疫及细胞免疫应答。

本研究通过简单工艺制备了最佳 N/P 比的 PS-RBD 纳米粒疫苗,其细胞毒性小且有良好的稳定性,可以更安全及高效递送 SARS-CoV-2 RBD 基因进入细胞并表达目的蛋白,免疫小鼠可产生较高免疫水平,是基因治疗在临床应用中的一种具有前景的载体系统,关于 PS-RBD 的保护效果有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Adil MT, Rahman R, Whitelaw D, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19[J]. Postgrad Med J, 2021, 97(1144): 110-116.
- [2] Chavda VP, Kapadia C, Soni S, et al. A global picture: therapeutic perspectives for COVID-19[J]. Immunotherapy, 2022, 14: 351-371.
- [3] Hadj HL. COVID-19 vaccines and variants of concern: a review[J]. Rev Med Virol, 2022, 32: e2313.
- [4] Acosta-Coley I, Cervantes-Ceballos L, Tejada-Benitez L, et al. Vaccines platforms and COVID-19: what you need to know[J]. Trop Dis Travel Med Vaccines, 2022, 8: 20.
- [5] Silveira MM, Moreira MSG, Mendona M. DNA vaccines against COVID-19: perspectives and challenges[J]. Life Sci, 2021, 267: 118919.
- [6] Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology[J]. Cell, 2020, 183(4): 1024-1042.
- [7] Gou LT, Lim DH, Ma W, et al. Initiation of parental genome reprogramming in fertilized oocyte by splicing kinase SRPK1-catalyzed protamine[J]. Phosphorylation Cell, 2020, 180(6): 1212-1227.
- [8] Dunne M, Bibby DC, Jones JC, et al. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles[J]. J Control Release, 2003, 92(1-2): 209-219.
- [9] Kim TW, Chung H, Kwon IC, et al. Polycations enhance emulsion-mediated *in vitro* and *in vivo* transfection[J]. Int J Pharm, 2005, 295(1-2): 35-45.
- [10] He H, Ye J, Liu E, et al. Low molecular weight protamine (LMWP): a nontoxic protamine substitute and an effective cell-penetrating peptide[J]. J Control Release, 2014, 193: 63-73.
- [11] 史迈, 江芮, 崔新霞, 等. 鱼精蛋白-siRNA 不同形貌复合体的制备、结构及药效学分析[J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(6): 1164-1171.
- [12] 胡海梅, 黄宏靓, 谭倩雯, 等. 鱼精蛋白/DNA 复合物的构建与生物性能评价[J]. 中南药学, 2010, 8(1): 11-15.
- [13] 吴雅琦, 李蒙, 邢昊楠, 等. 基于 PLGA 纳米粒的 SARS-CoV-2 DNA 疫苗的制备及初步评价[J/OL]. 药学报, 1-16.
- [14] 葛奕辰, 崔伟同, 蔡潇潇. 鱼精蛋白硫酸盐对 DNA 纳米结构入胞能力及胞内溶酶体逃逸的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(6): 783-789.
- [15] 王昊宇, 许慧敏, 常建桥. 纳米药物在肿瘤治疗与临床应用的发展与挑战[J]. 中国科学, 2022, 52(6): 795-813.
- [16] 李玲, 奚文松, 苏倩倩, 等. 不同粒径的纳米粒子在被细胞摄入过程中的相互影响[C]. 中国毒理学会, 2019: 160.
- [17] Sun Q, Zhou Z, Qiu N, et al. Shen Y. Rational design of cancer nanomedicine: Nanoproperty integration and synchronization[J]. Adv Mater, 2017, 29(14): 1606628.
- [18] Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2[J]. Nature, 2020, 584(7821): 443-449.
- [19] Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(577): 1555.
- [20] Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, et al. Interferongamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice[J]. Immunology, 2001, 103(4): 511-518.

【收稿日期】 2023-05-04 【修回日期】 2023-07-20