

DOI:10.13350/j.cjpb.241110

• 论著 •

2PreS1 重组蛋白的表达、纯化及疫苗效果评价*

胡明娜¹, 韩少伟^{2,3}, 张勇^{2,3**}, 李飞^{1**}(1. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 桂林医学院附属医院广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室;
3. 桂林医学院附属医院广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室)

【摘要】 **目的** 本研究旨在通过原核表达系统表达和纯化乙型肝炎病毒(HBV)相关抗原 PreS1 的二聚体蛋白 2PreS1, 并评估其在小鼠体内的免疫效果。 **方法** 设计并构建 pET28a-his-2PreS1 载体及对照载体 pET28a-his-PreS1, 在大肠埃希菌原核表达系统分别表达重组蛋白 2PreS1 及 PreS1。接着通过镍柱对目的蛋白纯化, 利用考马斯亮蓝染色和 Western blot 技术对目标蛋白进行鉴定。随后, 分别将纯化的 2PreS1 蛋白以及 PreS1 蛋白与弗式或 CpG 佐剂配制成疫苗, 接种至 8 周龄的 C57 小鼠中, 在初次免疫及两周后进行加强免疫。并于初次免疫后第 21 d 断尾采血, 通过酶联免疫吸附实验(ELISA)技术测定小鼠血清中的 PreS1 抗体水平。 **结果** 在 37 °C 220 rpm 时用 1 mmol/L IPTG 持续诱导 4 h 为 PreS1 蛋白的最优表达条件, 且在洗脱液中咪唑浓度为 500 mmol/L 时 PreS1 蛋白被洗脱; 而 2PreS1 蛋白则在 16 °C 200 rpm 时用 1 mmol/L IPTG 低温过夜诱导表达得最为理想, 且 2PreS1 蛋白在咪唑浓度为 100 mmol/L 被洗脱。通过 ELISA 分析, 发现无论是采用弗式还是 CpG 作为佐剂, 接种 2PreS1 疫苗的小鼠其血清中的 PreS1 抗体水平均显著高于仅接种 PreS1 疫苗的小鼠, 且 2PreS1 与弗式佐剂配合使用时能诱导出比与 CpG 佐剂配合时更强烈的免疫反应。 **结论** 本研究不仅成功地表达和纯化了 PreS1 及其二聚体蛋白 2PreS1, 而且还通过在小鼠中的免疫应答实验证明了 2PreS1 相比单体 PreS1 蛋白具有更高的免疫原性, 这表明了 2PreS1 作为疫苗成分的免疫效果更为优越。

【关键词】 乙型肝炎病毒(HBV); PreS1; 2PreS1**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2024)11-1300-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Nov.; 19(11):1300-1304, 1311.]

Expression, purification, and vaccine efficacy evaluation of the 2PreS1 recombinant protein

HU Ming-na¹, HAN Shaowei^{2,3}, ZHANG Yong^{2,3**}, LI Fei¹ (1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Key Laboratory of Molecular Medicine for Liver Injury and Repair in Guangxi, Affiliated Hospital of Guilin Medical College; 3. Key Laboratory of Basic Research on Diseases Related to Lipid Metabolism of Nerve Sphinges in Guangxi, Affiliated Hospital of Guilin Medical College)***

【Abstract】 **Objective** This study aimed to express and purify the dimeric protein of the Hepatitis B virus (HBV)-related antigen PreS1, referred to as 2PreS1, using a prokaryotic expression system, and to evaluate its immunogenicity in mice. **Methods** We designed and constructed the pET28a-his-2PreS1 vector and the control vector pET28a-his-PreS1, and expressed the recombinant proteins 2PreS1 and PreS1 in an *E. coli* expression system. The target proteins were purified using a nickel column, and identified by Coomassie Brilliant Blue staining and Western Blot analysis. Purified 2PreS1 and PreS1 proteins were formulated with Freund's or CpG adjuvant into vaccines, and administered to 8-week-old C57 mice. Mice received a primary immunization followed by a booster after two weeks. Tail blood samples were collected on day 21 after the initial immunization, and PreS1 antibody levels in mouse serum were measured using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Results** Optimal expression of the PreS1 protein was achieved by continuous induction with 1 mmol/L IPTG at 37 °C and 220 rpm for 4 hours, and PreS1 protein was eluted from the column using a wash buffer containing 500 mmol/L imidazole. In contrast, the best expression conditions for 2PreS1 protein were achieved by induction with 1 mmol/L IPTG at 16 °C and 200 rpm overnight, and 2PreS1 protein was eluted at an imidazole concentration of 100 mmol/L. ELISA analysis revealed that mice immunized with the 2PreS1 vaccine, whether formulated with Freund's or CpG adjuvant, exhibited significantly higher levels of PreS1 antibodies compared to those immunized with the PreS1 vaccine alone. Moreover, the combination of 2PreS1 with Freund's adjuvant induced a stronger immune response than with CpG adjuvant. **Conclusion** The study successfully expressed and purified both PreS1 and its dimeric protein

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82360390); 广西自然科学基金项目(No. 2022GXNSFBA035647); 广西科技厅中央财政引导地方科技发展专项资金(桂科 ZY21195024)** **【通讯作者】** 张勇, E-mail: zhangyong@glmc.edu.cn; 李飞, E-mail: lifei@cpu.edu.cn**【作者简介】** 胡明娜(2000-), 女, 安徽人, 在读硕士, 研究方向: 生药学。E-mail: a18956646021@163.com

2PreS1, and demonstrated through immunological assays in mice that 2PreS1 has higher immunogenicity compared to the monomeric PreS1 protein, indicating that 2PreS1 is a more effective vaccine component.

【Keywords】 Hepatitis B virus (HBV); PreS1; 2PreS1

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 属于嗜肝 DNA 病毒科^[1], 主要感染人体肝脏, 引发乙型肝炎。这种疾病以急性或慢性肝脏炎症损伤为主要临床表现, 是一类传播性强的疾病^[2-3]。据世界卫生组织统计, 每年病毒性肝炎相关疾病导致约 110 万人死亡, 以及 300 万例新发感染案例^[4]。尽管存在乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 疫苗作为常规预防措施, 并且诱导正常人群体内产生保护性抗体, 从而降低乙肝病毒感染率^[5], 但对于已经建立慢性乙肝病毒感染的患者而言 HBsAg 疫苗无法引起有效的抗体应答。这可能是由于病毒抗原长期诱导的抗原特异性免疫耐受所致, 因此, 迫切需要一种新的治疗手段, 打破慢性乙肝患者体内已建立的免疫耐受^[6]。

HBV 的表面蛋白 PreS1 位于病毒表面, 与病毒入侵宿主细胞的过程密切相关^[7-8], 同时在乙肝病毒的组装和释放中发挥重要作用^[9]。研究表明 PreS1 区域含有特定的抗原表位, 能够被免疫系统中的 T 细胞和 B 细胞识别, 从而突破免疫耐受, 诱导有效、持续的免疫应答, 实现功能性治愈^[10-11]。2017 年 Bian 等^[12] 研究发现, 以 PreS1 区域作为疫苗在 HBV 耐受模型内会引起较强的 CD4⁺ T 细胞免疫反应, 其产生的 anti-PreS1 抗体能够清除血液中的 PreS1 抗原和 HBV 病毒。然而, 鉴于 PreS1 的免疫原性较低, 如何提高机体对 PreS1 的高效抗体应答仍是当前面临的关键问题。Wang 等^[13] 研究表明基于铁蛋白纳米颗粒的 PreS1 纳米疫苗在 HBV 小鼠模型中会诱导高水平, 高亲和力, 持久的抗体应答以及免疫记忆。基于铁蛋白纳米颗粒的 PreS1 纳米疫苗虽展现出诱发强效免疫应答的潜力, 但其高生产成本和规模化生产的复杂性可能限制其广泛应用。2022 年, Han 等^[14] 针对 β 冠状病毒 S 蛋白的 RBD (受体结合域) 二聚体疫苗进行了研究, 发现在小鼠体内, 新冠病毒的嵌合 RBD 二聚体抗原产生的抗体水平明显高于单体 RBD 所诱导的抗体水平。受此启发, 推断采用 PreS1 二聚体蛋白可能会增强 PreS1 蛋白的免疫原性, 进而提高其作为疫苗成分的功效。

本研究旨在构建 PreS1 和 2PreS1 蛋白的原核表达载体, 表达纯化蛋白后, 进一步地在小鼠体内对 PreS1 和 2PreS1 蛋白的免疫原性进行评估, 结果报告如下。

材料与amp;方法

1 材料和试剂

C57 小鼠 (湖南斯莱克景达实验动物有限公司), IPTG (中国碧云天公司, 批号: ST098), 弗式不完全佐剂 (默克集团, 批号: F5506), CpG 佐剂 (中国泓迅生物, 批号: H35715), BCA 试剂盒 (晶科生物, 批号: E1WP2012), HisTrap (GE HealthCare, 批号: 11-0004-58), PrePacked Desalting Column (天地人和公司, 批号: SEC00C2), 山羊抗鼠 IgG (美国 Thermo 公司), Hind III HF (New England Biolabs, 批号: #R3104), ECORI-HF (New England Biolabs, 批号: R3101L), BL21 (DE3) 感受态 (生工生物工程有限公司, 批号: B628414-0100)。

2 重组质粒 pET28a-his-PreS1 和 pET28a-his-2PreS1 的构建

NCBI 查询 HBV 的 PreS1 序列, 2PreS1 为 PreS1 序列的头尾串联, 序列经过密码子优化后, 交由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

3 双酶切鉴定

实验组双酶切体系为: Hind III 0.5 μ L, ECORI-HF 0.5 μ L, 重组质粒 (pET28a-his-PreS1 和 pET28a-his-2PreS1) 1 μ g, 10 \times custmaster buffer 2 μ L, 二蒸水补足至 20 μ L; 对照组双酶切体系为: 重组质粒 (pET28a-his-PreS1 和 pET28a-his-2PreS1) 1 μ g, 6 \times DNA 上样缓冲液, 二蒸水补足至 20 μ L; 双酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C 2 h。

4 PreS1 和 2PreS1 蛋白的试表达

将 pET28a-his-PreS1 和 pET28a-his-2PreS1 质粒分别转化至 BL21 (DE3) 感受态中, 并用含有卡那霉素抗性的平板进行筛选, 挑取平板上的单克隆菌落至含有卡那霉素的 LB 培养基中过夜培养; 按 1:100 的比例将活化的菌液接种至 5 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 220 rpm 培养至菌液 A₆₀₀ 值为 0.6~0.8。此时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续在 37 $^{\circ}$ C 下进行 4 h 的诱导培养, 或在 16 $^{\circ}$ C 下过夜诱导。收集菌液后 9 500 r/min (离心半径 12 cm) 离心 5 min, 去上清, 用 1 mL 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 重悬沉淀, 使用功率为 100 W 的超声破碎仪, 设置工作模式为 2 s 开 1 s 关, 持续 10 min 以破碎菌体。之后, 将破碎后的菌液以 12 000 r/min (离心半径 12 cm) 离心 10 min, 收集上清作为样品, 并使用 600 μ L PBS 重新悬浮沉淀以制备样品。最后, 通过 SDS-PAGE 检测目标蛋白的表达情况。

5 PreS1 和 2PreS1 蛋白的纯化

将表达目标蛋白的菌株接种到含卡那霉素的培养基中,过夜培养;随后,以 1 : 100 的比例接种至 200 mL 同样含卡那霉素的培养基中,在 37 °C 和 220 rpm 的条件下培养,直至菌液的 A₆₀₀ 值达到 0.6~0.8。此时,加入 IPTG 至最终浓度 1 mmol/L 进行诱导,其中 PreS1 的诱导条件为 37 °C、220 rpm 培养 4 h;2PreS1 则在 16 °C、200 rpm 条件下过夜诱导。诱导结束后,收集菌液并离心以移除上清,再使用 35 mL PBS 重悬沉淀。使用功率为 500 W 的超声破碎仪,设置 5 s 工作 5 s 休息的模式进行 40 min,以破碎菌体。破碎后的上清经 9 500 r/min(离心半径 12 cm)离心 5 min 后,使用 0.22 μm 过滤器过滤。过滤后的上清通过 HisTrap 镍柱进行纯化,使用不同浓度(10、20、50、100、500 mmol/L)的咪唑洗脱液进行洗脱,每种浓度洗脱液每 1 mL 收集一管,共收集 5 管。收集的洗脱液通过 SDS-PAGE 制样并使用考马斯亮蓝进行染色以检测蛋白。通过 BCA 试剂盒测定脱盐后的蛋白浓度,并通过 SDS-PAGE 和 Western blot 技术检测纯化后的蛋白。

6 重组蛋白疫苗的制备及动物免疫

将重组蛋白与弗式佐剂(Freund's Adjuvant, FIA)充分混合至完全乳化,形成乳白色的液滴。若该液滴滴入水中能形成稳定的油滴,则说明重组蛋白疫苗制备成功。对于 CpG 佐剂,只需将重组蛋白直接与之均匀混合,即可获得另一种形式的重组蛋白疫苗。将 8 周龄的 C57 小鼠随机分成 6 组,每组 3 只。这些小鼠分别接种含 PreS1 与 FIA 混合的疫苗、含 2PreS1 与 FIA 混合的疫苗、含 PreS1 与 CpG 佐剂混合的疫苗、含 2PreS1 与 CpG 佐剂混合的疫苗,或仅接种生理盐水作为对照。在首次免疫两周后,对小鼠再次进行同样的疫苗或生理盐水注射。到了第 21 d,通过断尾采血的方法收集血液样本,并运用酶联免疫吸附测定(ELISA)技术来检测血清中 PreS1 抗体的水平。

7 ELISA 法检测小鼠血清中 PreS1 抗体的水平

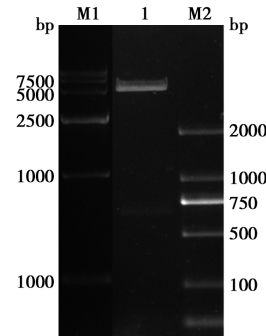
实验采用 ELISA 技术测定小鼠血清中 PreS1 抗体水平^[12]。将纯化后的 PreS1 蛋白以 PBS 稀释至浓度 2 μg/mL,并在 96 孔板中每孔添加 100 μL,随后在 4 °C 下孵育过夜以实现包被。次日,倾弃孔内溶液并使用含 0.05% Tween-20 的 PBS(PBST)清洗已包被的 96 孔板三次,每次 5 min。接着,在每孔中加入 5% 脱脂奶粉溶液 100 μL,于 37 °C 下封闭 1 h。之后,再次使用 PBST 清洗三次,每次 5 min。然后,将小鼠血清经 2% 脱脂奶粉进行梯度稀释后,每孔加入 100 μL,于 37 °C 孵育 1 h。继续使用 PBST 洗涤三次,每次 5 min。每孔随后加入 100 μL 经过 HRP 标记的山羊抗

鼠 IgG,于 37 °C 孵育 1 h。再次使用 PBST 清洗三次,每次 5 min。随后,向每孔加入 100 μL 四甲基联苯胺(TMB)显色液,并在 37 °C、避光条件下显色 15 min。最后,每孔加入 100 μL 终止液以终止反应,并使用酶标仪在 450 nm 波长处测量并记录 A 值。

结果

1 重组质粒的双酶切鉴定结果

使用 HindIII 和 ECORI-HF 内切酶鉴定重组质粒 pET28a-his-2PreS1,凝胶电泳显示双酶切后出现两条核酸条带,一条 750 bp,另一条 5 000 bp,这表明重组质粒构建成功(图 1)。



M1 DNA Maker 1pET28-his-2PreS1 双酶切产物 M2 DNA Maker

图 1 重组质粒 pET28a-his-2PreS1 双酶切鉴定结果

M1 DNA Maker 1pET28-his-2PreS1 double cleavage Product M2 DNA Maker

Fig. 1 Double enzyme digestion identification results of recombinant plasmid pET28a-his-2PreS1

2 PreS1 和 2PreS1 重组蛋白的表达

图 2A 所示,在 37 °C 下,经过 4 h 的 IPTG 诱导之后,诱导组在 15 ku 位置的全菌、上清和沉淀样品中均出现了目标 PreS1 蛋白的条带。图 2B 显示,在经过一夜的 IPTG 诱导之后,与未诱导组相比,25 ku 位置的全菌和上清样品中显著表达了目标 2PreS1 蛋白,这证明了 PreS1 和 2PreS1 蛋白的成功表达。

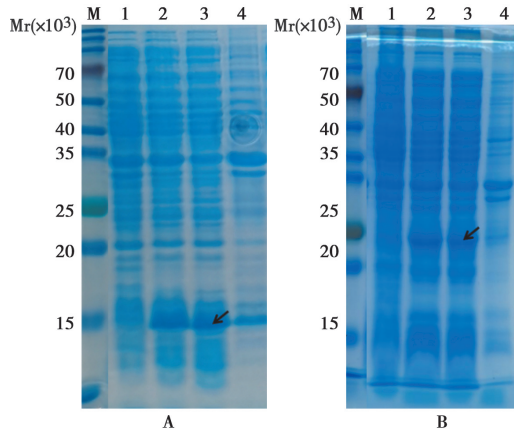
3 PreS1 和 2PreS1 重组蛋白的纯化

根据所需的蛋白表达条件,相应扩大培养并诱导目标蛋白的大量表达,随后采用镍柱进行纯化,通过收集洗脱液并使用 SDS-PAGE 进行分析。图 3A 显示,500 mmol/L 的洗脱液能够成功洗脱 PreS1 蛋白,图 3B 显示,含 100 mmol/L 咪唑的洗脱液能够洗脱 2PreS1 蛋白,这表明 PreS1 和 2PreS1 蛋白纯化成功。

4 PreS1 与 2PreS1 重组蛋白的考马斯亮蓝染色与 Western blot 检测

经考马斯亮蓝染色对纯化蛋白进行分析(图 4A)后,观察到在 15 ku 和 25 ku 处存在尺寸合适的蛋白条带。通过使用针对 His 标签的抗体(图 4B)和专用的 PreS1 抗体(图 4C)进行的 Western blot(WB)检测

进一步确认,这两条条带分别对应于 PreS1 和 2PreS1 蛋白,验证了其成功的表达与纯化。

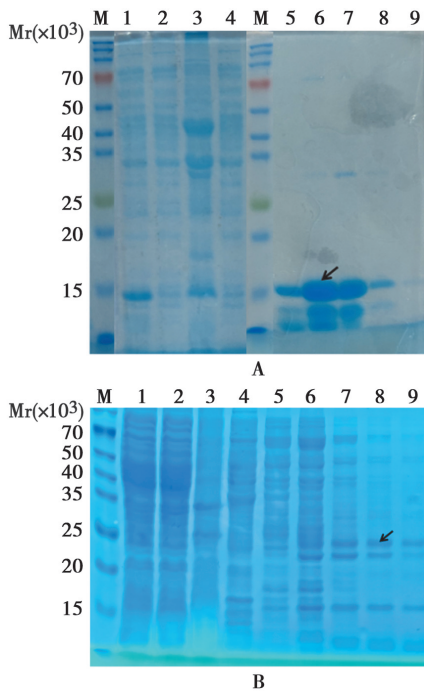


M 蛋白分子标准质量 1 未诱导细菌全菌 2 诱导后的细菌全菌 3 诱导后的细菌裂解上清液 4 诱导后的细菌裂解沉淀

图 2 37 °C 诱导 4 h 的 PreS1(A)和 16 °C 诱导过夜的 2PreS1(B) 重组蛋白的表达

M Protein molecular standard mass 1 Uninduced bacterial whole bacteria 2 Induced bacterial whole bacteria 3 Induced bacterial lysate supernatant 4 Induced bacterial lysate precipitate

Fig. 2 Expression of recombinant proteins of PreS1 (A) induced for 4 h at 37 °C and 2PreS1 (B) induced overnight at 16 °C

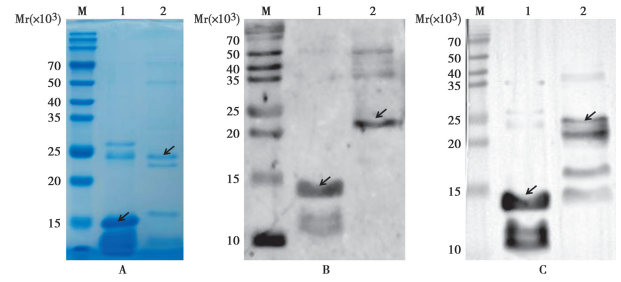


A M 蛋白分子标准质量 1 全菌 2 裂解上清液 3 裂解沉淀 4 流穿 5~9 500 mmol/L 咪唑洗脱 B M 蛋白分子标准质量 1 全菌 2 裂解上清液 3 裂解沉淀 4 流穿 5 10 mmol/L 咪唑洗脱 6~9 100 mmol/L 咪唑洗脱

图 3 重组蛋白 PreS1(A)和 2PreS1(B)的纯化

A M Protein molecular standard mass 1 Whole bacteria 2 Lysis supernatant 3 lysis precipitate 4 flow-through 5-9 500 mmol/L imidazole elution B M Protein molecular standard mass 1 whole bacteria 2 lysed supernatant 3 lysed precipitate 4 flow-through 5 10 mmol/L imidazole elution 6-9 100 mmol/L imidazole elution

Fig. 3 Purification of recombinant proteins PreS1 (A) and 2PreS1 (B)



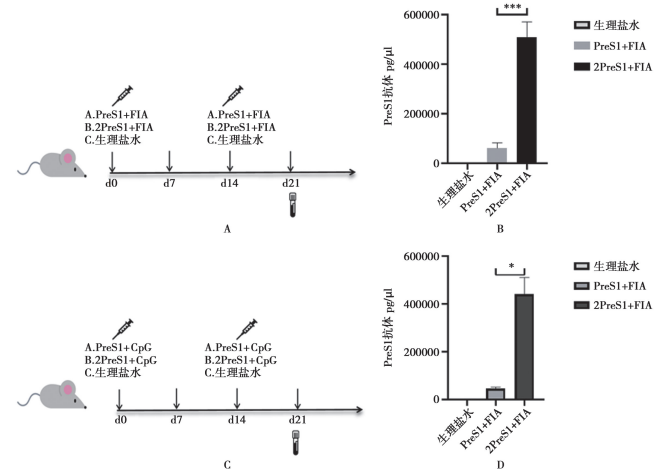
M 蛋白分子标准质量 1 PreS1 重组蛋白 2 2PreS1 重组蛋白
图 4 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测纯化后 PreS1 和 2PreS1 重组蛋白

M Protein molecular standard mass 1 PreS1 recombinant Protein 2 2PreS1 recombinant Protein

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting detection of Purified PreS1 and 2PreS1 recombinant proteins

5 重组蛋白疫苗效价评价

将纯化的重组蛋白分别与 FIA 或 CpG 佐剂配制成疫苗,随后对 C57 小鼠进行皮下注射。采血并利用 ELISA 方法检测小鼠血清中的 PreS1 抗体水平,具体的免疫方案见图 5A 和 C。图 5 显示,不论采用 CpG 还是 FIA 作为佐剂,接种 2PreS1 重组蛋白疫苗的小鼠产生的 PreS1 抗体水平显著高于接种 PreS1 重组蛋白疫苗的小鼠。这一结果表明,与 PreS1 重组蛋白相比,2PreS1 重组蛋白能够在小鼠体内激发更强烈的免疫响应。



纯化的重组蛋白与 FIA(A)或者 CpG 佐剂(C)制成疫苗,在初次免疫的 14 天后二次免疫,在第 21 天断尾取血;用 ELISA 检测注射 FIA 佐剂的疫苗(B)和与 CpG 佐剂的疫苗(D)后小鼠血清中 PreS1 抗体的水平,灰色柱状图代表 PreS1 与佐剂合用,黑色柱状图代表 2PreS1 与佐剂合用。与 PreS1 与佐剂联用相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 小鼠免疫方案及小鼠血清中 PreS1 抗体水平的检测

Purified recombinant proteins were formulated into a vaccine with FIA adjuvant (A) or CpG (C), and the second vaccine was administered 14 days after the initial vaccination, and blood was collected from the tail on day 21; the levels of PreS1 antibodies in the sera of mice vaccinated with the injected proteins with FIA adjuvant (B) and with CpG adjuvant (D) were measured by ELISA, with grey representing PreS1 in conjunction with the adjuvant, and black representing 2PreS1 in combination with adjuvant.

Fig. 5 Mouse immunization protocol and detection of PreS1 antibody levels in mouse serum

讨 论

在全球范围内,感染慢性乙肝的患者数量依然庞大,这是一个亟待解决的重大卫生问题。在感染乙肝病毒后患者肝细胞核内会产生稳定的共价环状 DNA,即 cccDNA,这会导致感染了乙肝病毒的患者会对其产生免疫耐受,从而使病毒在体内长期潜伏,难以清除^[15-16]。因此,研发新的治疗策略显得尤为重要和迫切。与常规的预防性疫苗不同,PreS1 疫苗其主要目标是打破乙肝患者体内的免疫耐受状态,激发或增强机体对乙肝病毒的免疫应答,从而有望清除病毒或控制病毒复制^[17-18]。然而,PreS1 疫苗的研发也面临着诸多挑战,由于 PreS1 蛋白分子量比较小,免疫原性较低,这在一定程度上限制了临床应用。因此,如何提高 PreS1 疫苗的免疫原性,增强其治疗效果,是当前 PreS1 疫苗开发的热点和难点之一。

相较于真核表达系统在表达病毒蛋白方面的应用,原核表达系统以其高效、快速且成本相对较低廉的显著特点,在蛋白质制备领域展现出独特的优势^[19]。原核表达系统利用原核生物(如大肠埃希菌)的细胞作为宿主,能够大量、快速地生产出所需的蛋白质^[20]。Bian 等^[12]就成功地通过原核表达系统表达了 PreS1 蛋白,并实现了纯化。因此在本实验中,我们利用原核表达系统的这些优点,通过基因工程技术,将 PreS1 序列的头尾进行串联,并对序列密码子优化后,将改造后的序列插入到 pET-28a 原核表达载体中,利用大肠埃希菌这一宿主细胞,实现了对 2PreS1 蛋白的高效表达。

为了获得高质量的重组蛋白,我们对表达以及纯化条件进行了优化。优化后的表达条件为在 37 °C 时经过 4 h 1 mmol/L IPTG 诱导和 500 mmol/L 咪唑浓度洗脱条件下,可以成功表达并纯化 PreS1 重组蛋白;而在 16 °C 经过 1 mmol/L IPTG 过夜诱导和 100 mmol/L 咪唑浓度洗脱条件下,可以表达并纯化 2PreS1 重组蛋白。通过 BCA 分析与考马斯亮蓝染色,我们发现 2PreS1 的产量相对较低。为了评估 PreS1 和 2PreS1 的免疫原性,我们将这些蛋白与不同佐剂混合制备成疫苗,并通过皮下注射的方式给予小鼠,通过断尾取血及 ELISA 检测来监测小鼠血清中 PreS1 抗体的水平。实验结果表明,2PreS1 的免疫原性显著优于 PreS1,且其免疫原性的强度与所使用的佐剂类型紧密相关;与 FIA 佐剂配合使用时能诱导出比与 CpG 佐剂配合时更强烈的免疫反应,产生的 PreS1 抗体水平是 CpG 佐剂组的 10 倍,这可能是由于 FIA 佐剂在某些特定条件下更能有效地促进抗原的加工和递呈,进而刺激机体产生更高水平的抗体。

值得注意的是,本研究的范围限于在小鼠模型中评估预防效果,并未探讨针对 HBV 的治疗性研究,这些结果为进一步开发针对 HBV 的治疗性疫苗提供了有益的参考和启示。

综上所述,本研究探索了 PreS1 及其二聚体 2PreS1 重组蛋白的表达与纯化方法。通过在小鼠模型中评估了它们的免疫原性,发现 2PreS1 蛋白相较于 PreS1 蛋白显示出更佳的免疫激活效果,虽然本研究的范围仅限于预防效果的评估,但这一发现为开发针对 HBV 的治疗性疫苗开辟了新途径。我们期待在未来的研究中能够更深入探讨 PreS1 疫苗的效果,为慢性乙肝患者提供更多的治疗选择。

【参考文献】

- [1] Yue T, Zhang Q, Cai T, et al. Trends in the disease burden of HBV and HCV infection in China from 1990-2019 [J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 122: 476-485.
- [2] Xu R, Hu P, Li Y, et al. Advances in HBV infection and replication systems in vitro [J]. *Virology*, 2021, 18(1): 105.
- [3] Jiang Y, Han Q, Zhao H, et al. The mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatocellular Carcinoma*, 2021, 8: 435-450.
- [4] Hsu YC, Huang DQ, Nguyen MH. Global burden of hepatitis B virus: current status, missed opportunities and a call for action [J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2023, 20(8): 524-537.
- [5] Mahmood F, Xu R, Awan MUN, et al. HBV vaccines: Advances and development [J]. *Vaccines*, 2023, 11(12): 1862.
- [6] Fang Z, Zhang Y, Zhu Z, et al. Monocytic MDSCs homing to thymus contribute to age-related CD8+ T cell tolerance of HBV [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(4): e20211838.
- [7] Asami J, Kimura K T, Fujita-Fujiharu Y, et al. Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP [J]. *Nature*, 2022, 606(7916): 1021-1026.
- [8] 冯天同, 朱传龙. 慢性乙型肝炎治疗性疫苗的研究现状及展望 [J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(2): 113-118.
- [9] Mazzaro C, Adinolfi LE, Pozzato G, et al. Extrahepatic manifestations of chronic HBV infection and the role of antiviral therapy [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(21): 6247.
- [10] Pantazica AM, Dobrica MO, Lazar C, et al. Efficient cellular and humoral immune response and production of virus-neutralizing antibodies by the Hepatitis B Virus S/preS116-42 antigen [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 941243.
- [11] De Crignis E, Hossain T, Romal S, et al. Application of human liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma [J]. *eLife*, 2021, 10: e60747.
- [12] Bian Y, Zhang Z, Sun Z, et al. Vaccines targeting preS1 domain overcome immune tolerance in hepatitis B virus carrier mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1067-1082.
- [13] Wang W, Zhou X, Bian Y, et al. Dual-targeting nanoparticle vaccine elicits a therapeutic antibody response against chronic hepatitis B [J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(5): 406-416.

(下转 1311 页)

- the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair [J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 263-294.
- [9] Rai R, Hu C, Broton C, et al. NBS1 phosphorylation status dictates repair choice of dysfunctional telomeres [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(5):801-817.
- [10] Myler LR, Gallardo IF, Soniat MM, et al. Single-molecule imaging reveals how Mre11-Rad50-Nbs1 initiates DNA break repair [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(5):891-898.
- [11] De Picciotto N, Cacheux W, Roth A, et al. Ovarian cancer: status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 101:50-59.
- [12] Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, et al. Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(1):20-37.
- [13] Zhang C, Li J, Aji T, et al. Identification of functional MKK3/6 and MEK1/2 homologs from *Echinococcus granulosus* and investigation of protoscolicidal activity of mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitors *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(1):e10143-18.
- [14] Laffitte M, Leprohon P, Hainse M, et al. Chromosomal translocations in the parasite *Leishmania* by a MRE11/RAD50-independent microhomology-mediated end joining mechanism [J]. *PLoS genetics*, 2016, 12(6):e1006117.
- [15] Genois M, Paquet E, Laffitte M, et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(1):40-73.
- [16] 李亚芬, 赵军, 吕国栋, 等. Veliparib 联合青蒿琥酯体外抗细粒棘球蚴作用机制的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(7):733-739.
- [17] Li Y, Wang S, Li P, et al. Rad50 promotes ovarian cancer progression through NF- κ B activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(23):10961-10972.
- [18] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112:531-552.
- [19] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sonderby CK, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4):420-423.
- [20] Chen Y, Yu P, Luo J, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT [J]. *Mamm Genome*, 2003, 14(12):859-865.
- [21] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5):1351-1362.
- [22] Rai S, Agrawal C, Shrivastava AK, et al. Comparative proteomics unveils cross species variations in *Anabaena* under salt stress [J]. *J Proteomics*, 2014, 98:254-270.
- [23] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1):D493-d496.
- [24] Geourjon C, Delage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6):681-684.
- [25] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1):W296-W303.
- [26] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, et al. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9):1189-1191.
- [27] 颜明智, 李锦田, 刘辉, 等. 细粒棘球绦虫腺苷活化蛋白激酶 AMPK α 生物信息学分析 [J]. *新疆医科大学学报*, 2021, 44(3):266-273.
- [28] 颜明智, 库尔班尼沙·阿马洪, 周婧, 等. 细粒棘球绦虫腺苷活化蛋白激酶 AMPK β 基因克隆及生物信息学分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1):65-70.
- [29] 周润, 周婧, 许少全, 等. 细粒棘球绦虫糖转运体早期响应脱水蛋白的生物信息学及系统发育分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(11):1296-1302, 1310.
- [30] Wang F, Ye B. Bioinformatics analysis and construction of phylogenetic tree of aquaporins from *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(9):3499-3511.
- [31] Qiu S, Huang J. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(1):31-37.
- [32] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism [J]. *Nature*, 2013, 496(7443):57-63.
- [33] Deshpande RA, Lee JH, Paull TT. Rad50 ATPase activity is regulated by DNA ends and requires coordination of both active sites [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9):5255-5268.

【收稿日期】 2024-05-28 【修回日期】 2024-08-16

(上接 1304 页)

- [14] Han Y, An Y, Chen Q, et al. mRNA vaccines expressing homo-prototype/Omicron and hetero-chimeric RBD-dimers against SARS-CoV-2 [J]. *Cell Res*, 2022, 32(11):1022-1025.
- [15] 尤红, 王福生, 李太生, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2022年版) [J]. *实用肝脏病杂志*, 2023, 26(3):457-478.
- [16] Nishida Y, Imamura M, Teraoka Y, et al. Serum PreS1 and HBsAg ratio reflects liver fibrosis and Predicts the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B Patients [J]. *J Viral Hepat*, 2021, 28(9):1304-1311.
- [17] Das S, Ramakrishnan K, Behera SK, et al. Hepatitis B vaccine and immunoglobulin: Key concepts [J]. *J Clin Transl Hepato*, 2019, 7(X):1-7.
- [18] Yan H, Wang C. Key Factors for "Fishing" NTCP as a functional receptor for HBV and HDV [J]. *Viruses*, 2023, 15(2):512
- [19] 解庭波. 大肠埃希菌表达系统的研究进展 [J]. *长江大学学报(自科版)医学卷*, 2008(3):77-82
- [20] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展 [J]. *生物技术*, 2012, 22(2):76-80.

【收稿日期】 2024-05-07 【修回日期】 2024-07-28