

DOI:10.13350/j.cjpb.220401

• 论著 •

乙型肝炎病毒截短L蛋白的表达及其与S蛋白生物信息学对比分析^{*}

王炜晓¹,赵丹莹¹,陈子杨¹,常东英¹,李可新¹,曹玉锋^{2***},常军亮^{1**}

(1.长春生物制品研究所有限责任公司,吉林长春130012;2.怡道生物科技(苏州)有限公司)

【摘要】 目的 分别构建乙型肝炎病毒截短L蛋白(NL蛋白)和M蛋白目的基因的真核表达质粒,并进行体外表达;运用生物信息学方法分析NL蛋白和S蛋白的生物信息学特征,对比预测分析NL蛋白与S蛋白的免疫原性。 方法 以全长L蛋白目的基因为模板,PCR扩增NL蛋白基因和M蛋白基因,分别与根据pCHO1.0改造后的表达载体pCHO1.0-1和pCHO1.0new-1构建重组质粒,共转染CHO-S细胞进行蛋白表达并利用阴离子交换层析方法进行蛋白纯化。通过SDS-PAGE和Western blot分析纯化蛋白的纯度及活性,利用透射电镜观察VLPs形成情况。利用生物信息学软件ProtParam分析NL蛋白和S蛋白的理化性质,利用Signal P5.0 Service和TMPRED分析蛋白的信号肽和跨膜区,利用NPS@SOPMA和Swissmodel分别预测蛋白的二级结构和三级结构,利用IEDB Analysis Resource分析预测蛋白的可及性、亲水性、β转角和线性抗原表位。**结果** 构建的pCHO1.0-1-NL和pCHO1.0new-1-M重组质粒序列正确,表达蛋白纯化后的纯度可达85%,纯化蛋白可被抗-HBs抗血清识别。透射电镜观察显示形成直径约为22 nm的VLPs。经生物信息学比较分析,NL蛋白为疏水性蛋白,含有3个跨膜结构,无信号肽,二级结构主要为无规则卷曲,结构较为松散。与NL蛋白相比较,单纯S蛋白则含有4个跨膜区域,并含有信号肽。IEDB Analysis Resource预测NL蛋白抗原优势表位,其前S蛋白氨基酸区域较S蛋白含有更多的抗原优势表位。**结论** 成功构建含前S1和前S2共表达载体,并同时表达含乙型肝炎病毒NL、M和S蛋白的VLPs。生物信息学分析了乙型肝炎病毒抗原优势表位的理论集中区域,为研发含有前S蛋白的新一代乙肝疫苗奠定了基础。

【关键词】 乙型肝炎病毒;前S蛋白;真核表达;生物信息学

【中图分类号】 R373.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)04-0373-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Apr;17(4):373-379, 387.]

The expression of hepatitis B virus envelope protein and its bioinformatics analysis

WANG Wei-xiao¹, ZHAO Dan-ying¹, CHEN Zi-yang¹, CHANG Dong-ying¹, LI Ke-xin¹, CAO Yu-feng², CHANG Jun-liang¹ (1. Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd., Changchun 130012, China; 2. Yidao Biotechnology (Suzhou) Co., Ltd.) ***

【Abstract】 **Objective** To express HBV envelope proteins *in vitro* by constructing eukaryotic expression plasmids of truncated L protein(NL protein) and M protein target genes. To Comparatively analyze the immunogenicity of NL protein and S protein and analyze both bioinformatics characteristics by using bioinformatics. **Methods** The NL and M target protein genes was amplified from the full-long L protein target gene by using PCR, and recombinant plasmid was constructed with the expression vector pCHO1.0-1 and pCHO1.0new-1. Two constructed expression plasmids were co-transfected into CHO cells through the transfection reagent. And then screened out stable expression cell lines. The protein expression is detected by ELISA and purified by anion exchange chromatography. The purity and activity of the purified protein were analyzed by SDS-PAGE and Western blot, and the formation of VLPs was observed by transmission electron microscope. Use the bioinformatics software to analyze the NL protein and S protein. Used ProtParam to analyze the physical and chemical properties of the two proteins, Signal P5.0 Service and TMPRED analyze the signal peptide and transmembrane region of the two proteins, NPS@SOPMA and Swiss model respectively predict the secondary structure and tertiary structure of two proteins, using IEDB Analysis Resource predicts the accessibility, hydrophilicity, beta turn and linear epitope of the two proteins. **Results** The sequencing results of pCHO1.0-1-NL and pCHO1.0new-1-M recombinant plasmids were correct. The purity of the proteins after expression and purification can reach 85%, and purified proteins can be recognized by anti-HBs antiserum. The result of the SDS-PAGE and Western Blot show that purified proteins contain

* 【基金项目】 吉林省科技发展计划项目(No. 20190404001YY)。

** 【通讯作者】 常军亮,E-mail:cjlcc2009@163.com;曹玉锋,E-mail:caoyufeng999@163.com

【作者简介】 王炜晓(1996-),男,山东青岛人,硕士研究生。主要研究方向:重组蛋白药物研究。E-mail:15666069532@163.com

glycosylated and non-glycosylated NL protein, M protein and S protein. 20000 times magnification of electron microscopy result show that VLPs with a diameter of about 22nm are formed. The analyses of bioinformatics show that the NL protein is a hydrophobic protein with three transmembrane structures and no signal peptide. The secondary structure is mainly random coils, and the structure is relatively loose. Unlike the NL protein, the S protein contains four transmembrane regions and a signal peptide. The comprehensive prediction of the dominant epitope of the NL protein showed that pre-S protein contains three antigenic dominant epitopes and S protein contains only one. One of the antigenic dominant epitopes is composed of pre-S protein and S protein together. Indicating that the amino acid region of the pre-S protein contained more dominant epitopes. **Conclusion** Successfully constructed a co-expression vector containing pre-S1 and pre-S2, and simultaneously expressed VLPs containing hepatitis B virus NL protein, M protein and S protein. Lay the experimental foundation for the development of a new generation of hepatitis B vaccine containing pre-S protein.

【Key words】 Hepatitis B virus; envelope protein; eukaryotic expression; bioinformatics

乙型病毒性肝炎是全球流行性传染病,根据 HBV 核苷酸全序列异质性 $\geqslant 8\%$ 或 S 基因序列核苷酸差异度 $\geqslant 4\%$,将乙型肝炎病毒分为 A~H 8 种基因型。根据抗原决定簇组成的不同,可将 HBV 分为 4 个主要血清型:ayw、adw、ayr、adr。我国在全球范围内属于 HBV 高流行区域,根据中国疾病预防控制中心 HBV 血清流行病学报告研究显示,我国主要流行的血清型为 adr_{q+} 和 adw₂。慢性乙型肝炎是严重的全球性的公共卫生难题,据 WHO 数据显示,2015 年全世界有 2.57 亿人存在慢性乙肝病毒感染。每年由乙肝引起的肝硬化和原发性肝癌而死亡的人数达 88.7 万人,只有 8% 的确诊乙肝病毒感染者接受治疗^[1]。我国约有 7000 万慢性乙肝病毒携带者^[2],在世界慢性乙肝感染者中占据很大比例。目前没有能够治愈乙肝的特效药物及方法,给患者家庭和社会带来很大的疾病负担。接种乙肝疫苗是目前唯一安全、经济、有效的预防措施^[3-4]。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种小型 DNA 病毒,属嗜肝 DNA 病毒科,基因组为部分双链环状 DNA 分子,长约 3.2kb,包含 4 个开放阅读框:前 S/S 基因区、前 C/C 基因区、P 基因区、X 基因区^[5-6]。其中 S 基因区编码的包膜蛋白中以 S 基因编码的 226 个氨基酸残基组成的蛋白质成份为主,称为小蛋白(small protein, SP),前 S2 蛋白与 S 蛋白组成了含 281 个氨基酸残基的中蛋白(middle protein, MP),前 S1、前 S2 及 S 基因三部分共同编码的大蛋白(large protein, LP)由 389 个氨基酸残基或 400 个氨基酸残基构成。NL 蛋白是去除 L 蛋白 N 段 2-20aa 的截短蛋白,由 381 个氨基酸构成。HBV 包膜蛋白具有不同的糖基化形式(P24、GP27、GP33、GP36、P39、GP42)^[7],对乙肝疫苗的研发具有重要意义。本研究通过对 NL 蛋白和 M 蛋白进行真核表达载体构建及蛋白表达,对其编码蛋白进行生物信息学对比分析,进一步研究含有前 S 区包膜蛋白的免疫特性,为新一代乙型肝炎疫苗的研发奠定实验基础。

材料与方法

1 材料

1.1 质粒、菌株及目的基因 pCHO1.0 质粒与 CHO-S 细胞系购自于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;pcDNA3.1 质粒由长春生物制品研究所生物技术室保存;感受态 Trans-T1 购自北京全式金生物技术有限公司;全长 L 蛋白目的基因由宝生物工程(大连)有限公司合成;乙肝病毒 adr NC-1 株的全序列由琦祖和等^[8]测定。

1.2 主要试剂 FastPfu DNA 聚合酶,质粒小提试剂盒,胶回收试剂盒和 T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物技术有限公司;Sfi I, Avr II, BstZ1I, EcoR V, Pac I, Kpn I 和 Asc I 限制性核酸内切酶购自 NEB(北京)有限公司;单片段无缝克隆试剂盒购自莫纳生物科技有限公司;羊抗-HBs 抗血清由长春生物制品研究所生物技术室保存;驴抗羊-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司;乙肝 HBsAg 检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),由吉林省库美生物科技有限公司合成。

2.2 质粒改造

2.2.1 G418 基因替换 以 pcDNA3.1 质粒为模板,以 G418-F 和 G418-R 为上、下游引物 PCR 扩增 G418 目的基因。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后使用胶回收试剂盒回收,命名为 G418 片段。以 pCHO1.0 质粒为模板,分别以 Asc I-F、Asc I-R 和 Kpn I-F、Kpn I-R 两对引物进行 PCR。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,53 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后使用胶回收

试剂盒回收,分别命名为 Asc 片段和 Kpn 片段。

以 Asc 片段、G418 片段和 Kpn 片段作为三段重叠 PCR 模板,以 Asc I-F 和 Kpn I-R 为上、下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后使用胶回收试剂盒回收,命名为 AGK 片段。

pCHO1.0 质粒经 Asc I 和 Kpn I 限制性核酸内切酶双酶切,收集酶切后载体,与 AGK 片段进行连接,通过同源重组酶 50 °C 反应 30 min,将重组产物转化 Trans-T1 感受态,经卡那霉素抗性(50 μg/mL)选择培养,挑取单克隆菌落,以 G418-F 和 G418-R 引物进行菌落 PCR 鉴定。阳性菌株扩增菌液送吉林省库美生物科技有限公司测序,测序正确的质粒命名为 pCHO1.0new。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Design of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	酶切位点 (下划线) Restriction site (underlined)
HBV-NL-F	AGGAACGGTCCGGGCC <u>CTAGGCCACC</u> ATGAATCCTCTGGGATT <u>CTTTCC</u>	Avr II
HBV-R	CATAGAGTATAATATAGAG <u>TATACTCAAAT</u> GTACACCCAAAGACA	BstZ17I
HBV-M-F	AGGAACGGTCCGGGCC <u>CTAGGCCACC</u> ATGCAGTGGAA <u>CTCCACAAAC</u>	Avr II
G418-F	ATGATTGAACAAGATGGATTGC	
G418-R	TCAGAAGAAC <u>CTCGTAAGAAGG</u>	
Kpn I-F	CCTTCTGAC <u>GAGTCTTCTGACGCCGCC</u> CCACGACC	
Kpn I-R	GTGCTGTGAC <u>GCTCGTCGAC</u>	
Asc I-F	GCCAATAG <u>GGCTGCTCAGCAG</u>	
Asc I-R	GGTGCAATCC <u>ATCTGTTCAATCATGGAA</u> GGTCGTC <u>AACTCGAGAA</u>	

2.2.2 第二表达盒切除 pCHO1.0 质粒和 pCHO1.0new 质粒经 Sfi I 限制性核酸内切酶酶切后进行核酸电泳并胶回收,通过 T4 DNA 连接酶进行酶切后质粒自连,连接产物转化至 Trans-T1 感受态菌株,涂布于 LB 固体培养基(50 μg/mL 卡那霉素),37 °C 培养 16 h,挑取单克隆菌落于 LB 液体培养基(50 μg/mL 卡那霉素)中扩增培养 16 h,取 200 μl 菌液快速裂解,与原质粒进行比大小鉴定,鉴定正确的质粒命名为 pCHO1.0-1,pCHO1.0new-1,菌液交由吉林省库美生物科技有限公司测序。

2.3 目的基因扩增 以 HBsAg 质粒为模板,以 HBV-NL-F 和 HBV-R 引物扩增 NL 蛋白目的基因,以 HBV-M-F 和 HBV-R 引物扩增 M 蛋白目的基因。

PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行胶回收。

2.4 表达质粒构建 pCHO1.0-1 和 pCHO1.0new-1 质粒经 Avr II 和 BstZ17I 限制性核酸内切酶双酶切后,收集载体片段,截短 L 蛋白目的基因构建至 pCHO1.0-1 质粒,M 蛋白目的基因构建至 pCHO1.0new-1 质粒,条件为同源重组酶 50 °C 重组 30 min。将重组产物转化 Trans-T1 感受态,经卡那霉素抗性(50 μg/mL)选择培养,挑取单克隆,进行菌落 PCR 鉴定,阳性菌株扩增菌液由吉林省库美生物科技有限公司测序,测序正确的重组表达质粒分别命名 pCHO1.0-1-NL 和 pCHO1.0new-1-M。

2.5 蛋白的表达及纯化 pCHO1.0-1-L 和 pCHO1.0new-1-M 表达质粒共转染 CHO-S 细胞,经嘌呤霉素、MTX 和 G418 加压筛选出稳定表达细胞系后,在 1 L 摆瓶中进行细胞扩增培养,表达目的蛋白。收获上清,经 PEG20000 浓缩 25 倍后置于 20 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 体系中透析 16 h,然后上样 Capto™ Q 阴离子柱,流速为 1 mL/min,依次用含 50、100、300 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)和 2 mol/L NaCl 进行洗脱,收集洗脱峰。

2.6 目的蛋白鉴定 纯化重组蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,以 20% FBS 的 PBS 室温封闭 1 h,PBST 洗膜 3 次;加入羊抗-HBs 抗血清(1:500),4 °C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次;加入 HRP-驴抗羊 IgG(1:1000),室温孵育 1 h,PBST 洗膜 5 次后经 DAB 增强显色试剂盒室温避光显色。

2.7 电镜观察 将纯化重组蛋白滴加至铜网上,置 1% 磷钨酸溶液中复染 5 min,透射电镜下观察 VLPs 形成情况。

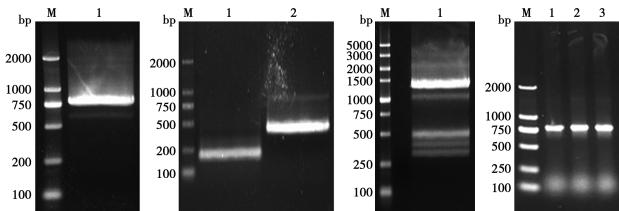
2.8 NL 和 S 蛋白生物信息学对比分析 运用 ProtParam 对比分析 NL 和 S 两种蛋白的理化性质,Signal P5.0 Service 分析预测蛋白的信号肽,TMPRED 分析蛋白的跨膜区域,NPS@SOPMA 和 Swissmodel 分析预测蛋白的二、三级结构,利用 IEDB Analysis Resource 预测蛋白的可及性、亲水性、β 转角和线性抗原表位,综合对比分析两种蛋白抗原预测表位。

结 果

1 改造质粒的鉴定

1.1 G418 基因替换 G418 片段、Asc 片段、Kpn 片段和 AGK 片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,大小分别为 800 bp(图 1A)、187 bp(图 1B1)、400 bp(图 1B2)、1 400 bp(图 1C),均与理论值相符。重组菌落 PCR 产

物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 1-3 号菌落扩增片段均为 750 bp(图 1D), 与预期相符。经测序, 改构质粒 pCHO1.0new 构建正确。



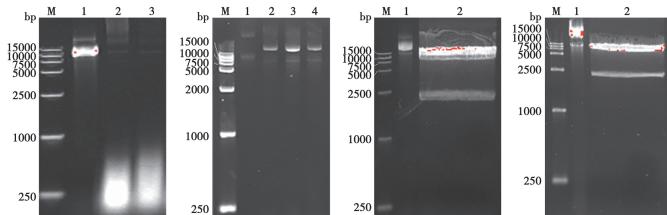
A1 G418 片段 B1 Asc 片段 B2 Kpn 片段 C1 AGK 片段 D1-3 菌落 PCR 鉴定

图 1 质粒改造 PCR 产物电泳图

A1 G418 fragment B1 Asc fragment B2 Kpn fragment C1 AGK fragment D1-3 Colony PCR results

Fig. 1 Electrophoresis of plasmid modified PCR products

1.2 第二表达框切除 pCHO1.0 质粒 Sfi I 酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 获得 10 000 bp 的目的片段和 2 300 bp 的第二表达框片段(图 2A2), 与理论值相符。pCHO1.0new 质粒 Sfi I 酶切片段同前(图 2B2)。快速碱裂法提取的质粒与原质粒经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行大小比较, pCHO1.0-1 质粒小于 pCHO1.0 质粒(图 2C), pCHO1.0new-1 质粒小于 pCHO1.0new 质粒(图 2D)。测序鉴定质粒 pCHO1.0-1 和 pCHO1.0new-1 构建正确。



A1 pCHO1.0 质粒 A2 pCHO1.0 Sfi I 酶切质粒 B1 pCHO1.0new 质粒 B2 pCHO1.0new Sfi I 酶切质粒 C1 pCHO1.0 质粒 C2-4 pCHO1.0-1 质粒 D1 pCHO1.0new 质粒 D2-3 pCHO1.0new-1 质粒

图 2 表达框切除电泳图

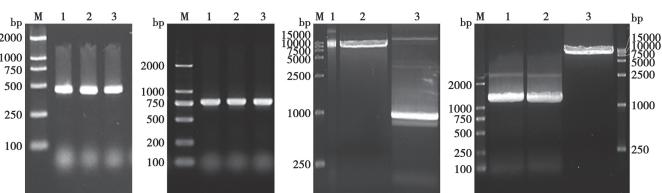
A1 pCHO1.0 plasmid A2 pCHO1.0 SfiI digested plasmid B1 pCHO1.0new plasmid B2 pCHO1.0new SfiI digested plasmid C1 pCHO1.0 plasmid C2-4 pCHO1.0-1 plasmid D1 pCHO1.0new plasmid D2-3 pCHO1.0new-1 plasmid

Fig. 2 Electrophoresis of expression box excision

2 目的基因扩增及重组载体鉴定

NL 蛋白基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 大小 1 200 bp(实际大小 1 137 bp)(图 3A1-2), 与预期相符。M 蛋白基因 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 大小 800 bp(实际大小 840 bp)(图 3B3), 与预期相符。对 pCHO1.0-1-NL 进行菌落 PCR 鉴定, 扩增片段为 750 bp(图 3C), pCHO1.0new-1-M 菌落 PCR 扩增片段为 480 bp(图 3D), 均与理论值相符。测序鉴定 pCHO1.0-1-NL 与 pCHO1.0new-1-M 质粒

构建正确。



A1-2 NL 蛋白目的基因 A3 pCHO1.0-1 Acr II /Bstz17 I 酶切质粒 B1 pCHO1.0new-1 质粒 B2 pCHO1.0new-1 Acr II /Bstz17 I 酶切质粒 B3 M 蛋白目的基因 C1-3 pCHO1.0-1-NL 菌落 PCR D1-3 pCHO1.0new-1-M 菌落 PCR

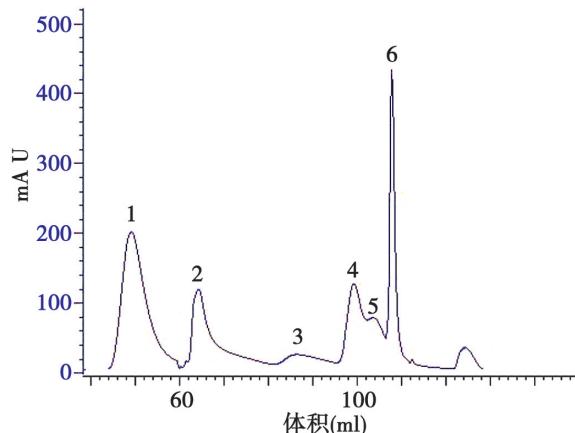
图 3 pCHO1.0-1-NL 和 pCHO1.0new-1-M 构建电泳图

A1-2 NL protein target gene A3 pCHO1.0-1 AcrII/Bstz17I digested plasmid B1 pCHO1.0new-1 plasmid B2 pCHO1.0new-1 AcrII/Bstz17I digested plasmid B3 M protein target gene C1-3 pCHO1.0-1-NL colony PCR result D1-3 pCHO1.0new-1-M colony PCR result

Fig. 3 Electrophoresis of pCHO1.0-1-NL and pCHO1.0new-1-M construction

3 目的蛋白的纯化及活性鉴定

阴离子交换层析峰形图见图 4。ELISA 检测显示目的蛋白主要集中在峰 4、峰 5 和峰 6。对 3 个峰的洗脱产物 PBS 透析和浓缩后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析(图 5)。以峰 4 目的蛋白含量最高, 纯度为 85% 左右, 且 NL、M 和 S 蛋白均能被羊抗-HBs 抗血清识别。



1 流穿峰 250 mmol/L NaCl 洗脱峰 3100 mmol/L NaCl 洗脱峰 4300 mmol/L NaCl 洗脱峰-1 5300 mmol/L NaCl 洗脱峰-2 62 mol/L NaCl 洗脱峰

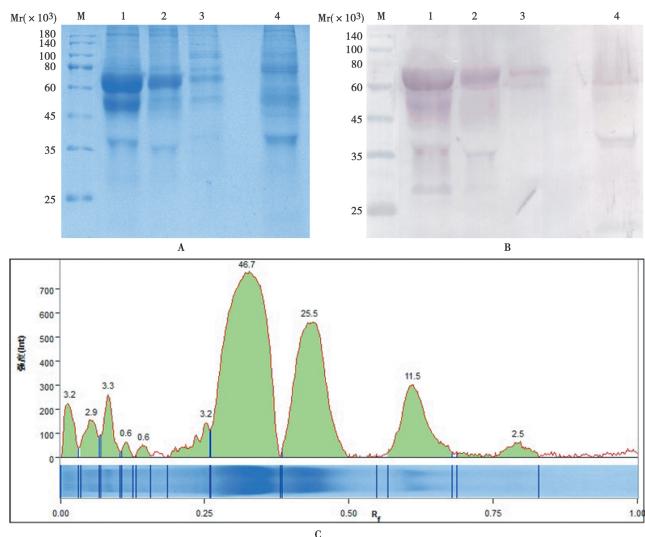
图 4 包膜蛋白离子交换层析纯化峰形图

1 Flow-through peak 250 mmol/L NaCl elution peak 3100 mmol/L NaCl elution peak 4300 mmol/L NaCl elution peak-1 5300 mmol/L NaCl elution peak-2 62 mol/L NaCl elution peak

Fig. 4 Peak shape of envelope protein ion exchange chromatography purification

4 电镜观察

纯化蛋白进行电镜观察, 可见直径约为 22 nm 的颗粒, 大小较为均匀(图 6)。



A SDS-PAGE analysis M protein marker 1 300 mmol/L NaCl洗脱峰-1 2 300 mmol/L NaCl洗脱峰-2 3 2 mol/L NaCl洗脱峰-4 纯化前样品 B Western blot analysis 1 300 mmol/L NaCl洗脱峰-1 2 300 mmol/L NaCl洗脱峰-2 3 2 mol/L NaCl洗脱峰-4 纯化前样品 C 300 mmol/L NaCl洗脱峰-1 包膜蛋白纯化后纯度分析

图 5 HBV 包膜蛋白 SDS-PAGE、Western blot 分析

A SDS-PAGE protein marker 1 300 mmol/L NaCl elution peak-1 2 300 mmol/L NaCl elution peak-2 3 2 mol/L NaCl elution peak 4 Sample before purification B Western blot 1 300 mmol/L NaCl elution peak-1 2 300 mmol/L NaCl elution peak-2 3 2 mol/L NaCl elution peak 4 Sample before purification C 300 mmol/L NaCl elution purity analysis of peak-1 envelope protein after purification

Fig. 5 HBV envelope protein SDS-PAGE, Western blot analysis

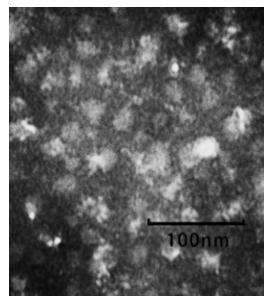


图 6 电镜下的纯化胞膜蛋白颗粒(20000×)

Fig. 6 Results of protein electron microscopy after purification of cell membrane protein

5 NL 蛋白生物信息学分析

5.1 理化性质 Protparam 软件预测 NL 蛋白和 S 蛋白均为不稳定蛋白, 不稳定性系数分别为 56.70 和 59.49; 预测两种蛋白均为疏水性蛋白, 亲水平均值分别为 0.166 和 0.670。两种蛋白理化特性对比见表 2。

5.2 蛋白质结构 NPS@SOPMA 预测 NL 蛋白由 α 螺旋(24.74%), β 转角(5.53%), 延伸桥(8.68%)和无规则卷曲(61.05%)构成(图 7), β 转角和无规则卷曲占二级结构总数的 66.58%, 表明 NL 蛋白抗原表位容易在这些位置产生。无规则卷曲含量高, 预示

NL 蛋白质结构较为松散。S 蛋白主要由 α 螺旋(42.48%), β 转角(6.19%), 延伸桥(9.73%)和无规则卷曲(41.59%)构成, 主要结构组成与 NL 蛋白相同, S 蛋白同样属于松散性结构。

利用 Expasy 工具中 Swissmodel 软件在线预测 NL 蛋白和 S 蛋白的三维立体结构, 结果见图 8。NL 蛋白和 S 蛋白中存在大量的无规则卷曲和 α -螺旋结构, 结构较松散, 与二级结构预测结果一致。

表 2 NL 和 S 蛋白理化性质比较

Table 2 Comparative analysis of physicochemical properties of NL protein and S protein

理化参数 Physical and chemical parameters	NL 蛋白 NL protein	S 蛋白 S protein
氨基酸总数	381	226
原子总数	5811	3573
相对分子质量	41711.24	25397.23
理论等电点	7.5	8.21
分子式	C ₁₉₃₂ H ₂₈₆₅ N ₄₈₁ O ₅₁₁ S ₂₂	C ₁₁₉₉ H ₁₇₈₅ N ₂₇₅ O ₂₉₄ S ₂₀
不稳定系数	56.70	59.49
亲水性平均值	0.166	0.670
主要氨基酸组成	脯氨酸(12.9%) 亮氨酸(11.6%) 丝氨酸(9.5%)	亮氨酸(15.5%) 脯氨酸(10.6%) 丝氨酸(10.2%)
预计半衰期	30 h(哺乳动物, 体外) >20 h(酵母细胞, 体外) >10 h(大肠埃希菌, 体外)	30 h(哺乳动物, 体外) >20 h(酵母细胞, 体外) >10 h(大肠埃希菌, 体外)

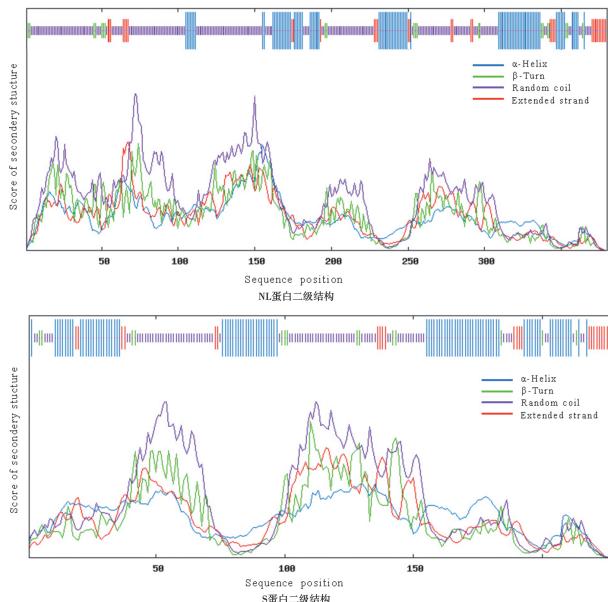


图 7 NL 和 S 蛋白二级结构预测

Fig. 7 Secondary structure prediction analysis

5.3 信号肽及跨膜区 采用 Signal P5.0 Service 预测 NL 蛋白中 SP 值为 0.0068(小于 0.5), 即不存在信号肽; 预测 S 蛋白中 SP 值为 0.5055(大于 0.5), 在 27 位苏氨酸(Thr)处存在剪切位点, 可能存在信号肽(图 9)。

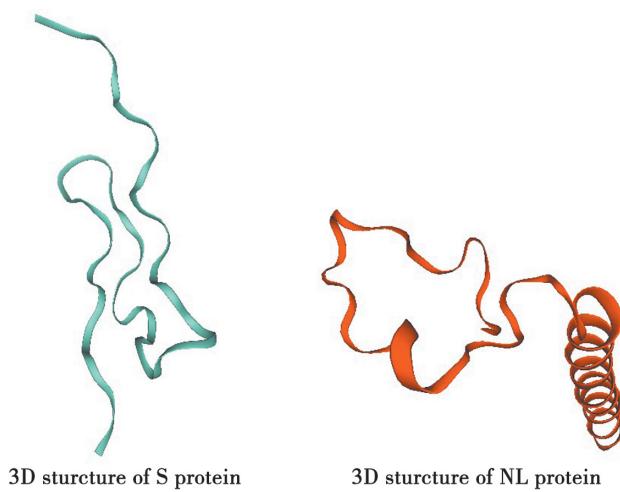


图 8 NL 和 S 蛋白三级结构

Fig. 8 3D structure of NL protein and S protein

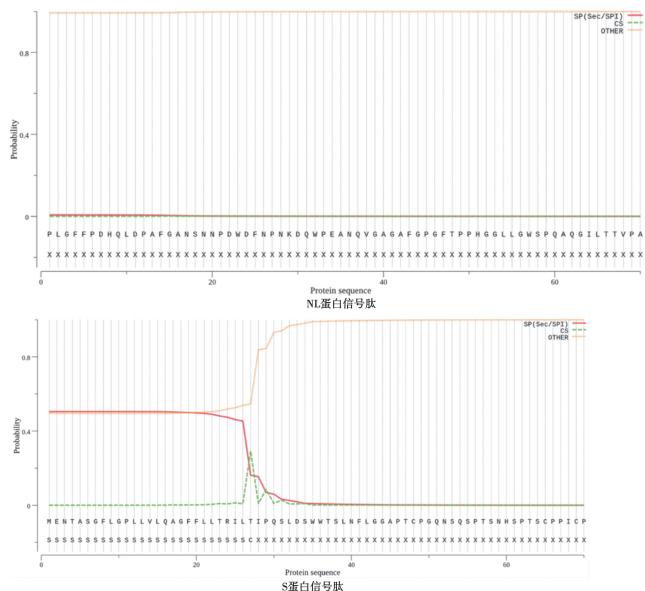


图 9 NL 和 S 蛋白信号肽预测

Fig. 9 The protein of NL and S signal peptide prediction

利用 TMPRED 工具预测 NL 蛋白存在 3 个跨膜区, 分别是: 235-253, 324-346, 356-378; 预测 S 蛋白含有 4 个跨膜区, 分别为: 5-27, 80-98, 170-192, 202-224(图 10)。通过对分析, NL 蛋白中的跨膜氨基酸区域全部位于 S 蛋白氨基酸区, 前 S 区域均为胞外区, 并且由于该区域的结构影响, 使得 S 蛋白一跨膜区转变为胞外区。

5.4 抗原优势表位 分析 NL 蛋白前 S 区和 S 区的可及性(可及性越大对应的氨基酸更容易与相应抗体结合), 有 6 个分值较高的氨基酸区域, 分别为: 18-27, 72-89, 91-108, 148-159, 206-216, 267-272(图 11)。

预测 NL 蛋白前 S 区和 S 区的线性表位。阈值线以上的氨基酸区域较适合作为抗原抗体结合的部位, 主要有 4 个, 分别为: 5-159, 191-222, 265-289, 294-298(图 12)。

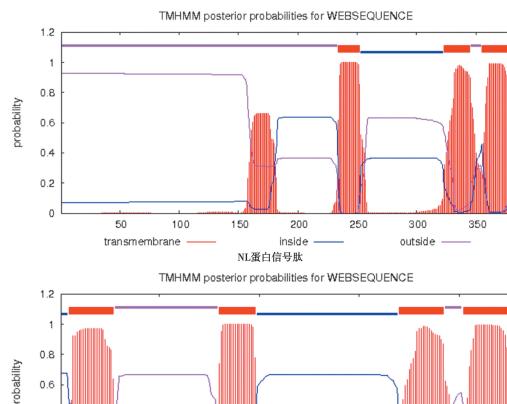


图 10 NL 和 S 蛋白跨膜区分析

Fig. 10 NL protein transmembrane analysis

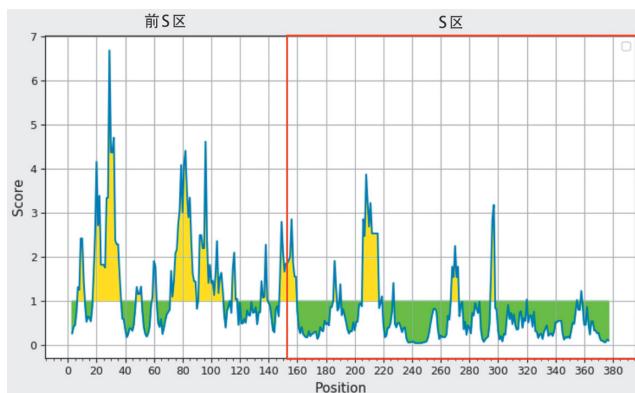


图 11 NL 蛋白前 S 区与 S 蛋白区可及性对比

Fig. 11 Comparison and prediction of the accessibility of the front S region and S protein region of NL protein

预测 NL 蛋白前 S 区和 S 区的亲水性(抗原表位亲水性越强越容易与抗体相识别结合)。NL 蛋白中主要存在 9 个在阈值以上的亲水氨基酸区域, 分别是: 6-55, 57-69, 72-112, 121-144, 149-166, 183-189, 195-228, 293-292, 293-306(图 13)。

预测 NL 蛋白前 S 区和 S 区 β 转角(β 转角一般作为凸出结构位于蛋白质位置表面, 容易产生扭曲结构, 更容易与抗体结合。由于 β 转角的生物学特性, 使得 β 转角存在的区域更容易形成抗原表位)。阈值线以上的区域共有 9 个, 分别为: 12-38, 42-66, 68-99, 121-134, 146-167, 183-231, 260-281, 283-311, 351-362(图 14)。

综合分析乙肝病毒 NL 蛋白的可及性、线性表位、蛋白亲水性和 β 转角的预测结果, 共预测出 5 个氨基酸区域作为抗原表位, 分别为: 18-27, 72-89, 91-99, 149-159, 206-216。相对于乙肝病毒 S 蛋白氨基酸区域, 前 S 蛋白氨基酸区域包含更丰富的潜在抗原表位,

前S区含有3个抗原预测表位,前S区与S区共同形成一个抗原预测表位,S区含有一个抗原预测表位。

讨 论

乙型肝炎病毒属于小型DNA病毒,HBsAg基因利用同一个开放阅读框的不同起始密码子分别编码L、M和S蛋白,本研究将构建的含有NL和M蛋白基因的表达载体共转染至CHO-S细胞中,可共同表达NL、M和S蛋白,有效组装形成VLPs。目前我国的乙型肝炎疫苗仅含有S蛋白作为免疫原,此类疫苗在大规模人群接种后的血清流行病学观察中,有5%~10%的成人和1%~2%新生儿不产生保护性抗体^[9-10],这促使进一步研究免疫原性更好的乙肝疫苗。有研究发现,前S蛋白具有很强的免疫原性,能够增强机体对S蛋白的免疫应答,克服机体对S蛋白的无反应状态,并且前S抗原相关抗体的出现早于其他抗体^[11-12]。本研究表达的包膜蛋白中含有前S蛋白,通过蛋白质分子层面的验证,能够被羊抗HBsAg抗血清识别,为新一代乙型肝炎疫苗的研发奠定了良好的实验基础。

采用生物信息学方法对蛋白进行生物学特性的分析和抗原表位的筛选已经被广泛应用于疫苗的分子设计、抗体药物的开发和疾病诊断等领域^[13]。通过对NL蛋白和S蛋白理化性质的分析,两种蛋白均属于疏水性蛋白,结构松散,稳定性较差,这与实际的研究过程中蛋白的理化性质相符。综合分析NL蛋白氨基酸区域的生物信息,5个潜在抗原表位中有3个完全位于前S蛋白区,S蛋白区含有1个。对乙型肝炎病毒NL蛋白和S蛋白的二级结构和跨膜结构分析显示,NL蛋白中前S氨基酸区域具有很高比例的无规则卷曲结构,这有利于抗原表位的形成,该区域同时位于包膜外区,亲水区域比例高,更容易与抗体产生特异性结合。S蛋白多为跨膜结构,与NL蛋白相比 α -螺旋占主要部分,与抗体结合效果不如NL蛋白。通过生物信息学综合分析,在NL蛋白前S氨基酸区域中抗原预测表位丰富,说明前S蛋白本身有较强的免疫原性,可以作为乙型肝炎疫苗的有效抗原组成成份,提高疫苗保护率。

前S蛋白作为乙型肝炎疫苗的抗原组成还有另一个优势,即前S1含有与HBV受体牛磺胆汁酸钠共转运蛋白(NTCP)结合的区段^[14-16],所产生的抗体具有阻断病毒附着和入侵肝细胞的效应;前S2含有蛋白水解的敏感区段,能够以人血清多聚白蛋白(PHSA)为介导使乙型肝炎病毒附着并感染肝细胞^[17],这也是乙型肝炎病毒具有嗜肝性的重要原因。故含前S1和前S2蛋白的疫苗不仅能够增强免疫原性,还能增强抗体

的中和效应。

对影响乙型肝炎病毒包膜蛋白分泌的研究发现,前S1区2-19个氨基酸为疏水性氨基酸,可与细胞内质网牢固结合,影响乙型肝炎病毒L蛋白的分泌,进而影响包膜蛋白的产量^[18]。本研究构建了去除前S1区2-20个氨基酸的NL蛋白目的基因表达载体,与M蛋白目的基因表达载体共转染表达乙型肝炎病毒包膜蛋白,在保证蛋白有效免疫原性的前提下提高了蛋白的表达产量。为大规模量产奠定了基础。

本研究成功构建了乙型肝炎病毒包膜蛋白基因重组真核表达质粒pCHO1.0-1-NL和pCHO1.0new-1-M,并在体外进行了表达和纯化。经生物信息学预测NL蛋白较S蛋白含有更丰富的抗原表位,可通过动物实验进一步验证本研究所形成VLPs的免疫原性,进一步明确前S蛋白对于乙型肝炎疫苗的价值,为开发新一代乙型肝炎疫苗奠定基础。

【参考文献】

- [1] 国际流行病学传染病学杂志编辑部.世界卫生组织发布《2017年全球肝炎报告》[J].国际流行病学传染病学杂志,2017,44(4):227.
- [2] Liu J, Liang W, Jing W, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitisB disease, China [J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3):230-238.
- [3] Chen S, Li J, Wang D, et al. The hepatitis B epidemic in China should receive more attention [J]. Lancet, 2018, 391(10130):1572.
- [4] 郭秀婵,仪忠军,毕静平.我国中华地鼠卵巢(CHO)细胞表达重组乙肝疫苗发展现状[J].疾病监测,1999,14(6):41-42.
- [5] Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B [J]. Lancet, 1993, 342(8883):1335-1340.
- [6] Shih C, Yang C C, Choijilsuren G, et al. Hepatitis B Virus [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(4):386-387.
- [7] Shouval D, Ilan Y, Adler R, et al. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines [J]. Vaccine, 1994, 12(15):1453-1459.
- [8] 琦祖和,阎珺,熊伟军,等.乙型肝炎病毒adr NC-1 DNA的全顺序测定[J].中国科学(B辑 化学 生物学 农学 医学 地学),1988(12):1300-1304.
- [9] Akcay IM, Katrinli S, Ozdil K, et al. Host genetic factors affecting hepatitis B infection outcomes: Insights from genome-wide association studies [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(30):3347-3360.
- [10] Alper C, Kruskall M, Marcus-Bagley D, et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine [J]. The New England J Med, 1989, 321(11):708-712.
- [11] Milich DR, McLachlan A, Thornton GB. T-cell recognition of pre-S regions of HBsAg can bypass nonresponse to the S region [J]. Adv Exper Med Biol, 1987(225):233-239.

(下转 387 页)

- [12] Wang Q, Dou Y, Yang X, et al. Prokaryotic expression of f protein from PPRV and characterization of its polyclonal antibody [J]. Monoclonal Antib Immunodiagn Immunother, 2013, 32(1): 26-31.
- [13] 翟军军. 小反刍兽疫病毒全长 cDNA 的构建及 DNA 疫苗的免疫学研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
- [14] Dhar P, Sreenivasa BP, Barrett T, et al. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV) [J]. Vet Microbiol, 2002, 88(2): 153-159.
- [15] Seth S, Shaila MS. The fusion protein of Peste des petits ruminants virus mediates biological fusion in the absence of hemagglutinin-neuraminidase protein [J]. Virology, 2001, 289(1): 86-94.
- [16] Diallo A, Minet C, Le Goff C, et al. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control [J]. Vaccine, 2007, 25(30): 5591-5597.
- [17] 陈伟业, 曲林茂, 胡森, 等. 表达小反刍兽疫 H 蛋白的重组山羊痘病毒疫苗[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4): 496-502.
- [18] 杨勃. 小反刍兽疫病毒诱导宿主细胞持续自噬的分子机制研究[D]. 西北农林科技大学, 2019.
- [19] Yan F, Li E, Li L, et al. Virus-like particles derived from a virulent strain of pest des petits ruminants virus elicit a more vigorous immune response in mice and small ruminants than those from a vaccine strain [J]. Front Microbiol, 2020, 11(609): 1-14.
- [20] Liu FX, Wu XD, Liu WH, et al. Current perspectives on conventional and novel vaccines against peste des petits ruminants [J]. Veter Res Commun, 2014, 38(4): 307-322.
- [21] Zhao H, Njeumi F, Parida S, et al. Progress towards eradication of peste des petits ruminants through vaccination [J]. Viruses, 2021, 13(1): 59.
- [22] Jia XX, Wang H, Liu Y, et al. Development of vaccines for prevention of peste-des-petits-ruminants virus infection [J]. Microb Pathog, 2020(142): 104045.
- [23] Kamel M, El-Sayed A. Toward peste des petits virus (PPRV) eradication: Diagnostic approaches, novel vaccines, and control strategies [J]. Virus Res, 2019(274): 197774.
- [24] G D W, Adama D, Giovanni C. Peste des petits ruminants in Africa: a review of currently available molecular epidemiological data, 2020 [J]. Arch Virol, 2020, 165(10): 2147-2163.
- [25] 肖敏, 包世俊, 邢小勇, 等. 小反刍兽疫病毒甘肃株 F 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(3): 477-484.
- [26] 于瑞嵩, 高位相, 李凤平, 等. 西藏株小反刍兽疫病毒 H 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2183-2190.

【收稿日期】 2022-01-15 【修回日期】 2022-03-30

(上接 379 页)

- [12] Klinkert MQ, Theilmannl, Pfaff E, et al. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection [J]. J Virol, 1986, 58(2): 522-525.
- [13] 梁文娟, 张荣光, 段广才, 等. 基于 CRISPR/Cas 的大肠埃希菌分子标志物的监测研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(8): 1080-1086.
- [14] Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition [J]. J Virol, 2005, 79(15): 9786-9798.
- [15] Sun Y, Qi Y, Peng B, et al. NTCP-Reconstituted In Vitro HBV Infection System [J]. Method Mol Biol (Clifton, NJ), 2017, 1540: 1-14
- [16] Yan H, Liu Y, Sui J, et al. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection [J]. Antiviral Res, 2015(121): 24-30.
- [17] Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, et al. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region [J]. J Virol, 1989, 63(5): 1981-1988.
- [18] Persing DH, Varmus HE, Ganem D. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide [J]. Science, 1986(234): 1388.

【收稿日期】 2021-11-19 【修回日期】 2022-02-09